



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

Chlortetracycline이 우분의  
혐기성 소화에 미치는 영향에 관한 연구  
- Chlortetracycline의 존재형태를 중심으로 -

Effect of Chlortetracycline on  
Anaerobic Digestion of Cattle Manure:  
Focused on Chemical Forms of Chlortetracycline

2017년 8월

서울대학교 대학원

건설환경공학부

이 창 민

## 국문초록

가축 사육의 산업화로 인해 유기성 폐기물인 가축분뇨가 대량으로 집약되어 발생하고, 그 양이 증가하고 있다. 이에 따라 가축분뇨의 효율적인 처리가 필요하다. 가축 분뇨 처리 방법 중 혐기성 소화 (anaerobic digestion)는 경제적이고 친환경적인 방법으로 사용되어 왔다. 혐기성 소화는 혐기성 조건에서 혐기성 미생물이 유기물을 기질로 하여 대사함으로써 감량시키고, 최종산물로서 메탄과 이산화탄소가 발생하는 일련의 과정이다.

배출된 분뇨에는 가축의 질병 치료 및 성장 촉진 목적으로 사용된 항생제가 포함되어 있다. 항생제는 미생물의 단백질 합성저해, 세포벽 약화 등의 기작을 통해 미생물 성장을 저해하는 물질이다. 그 중에서 chlortetracycline (CTC)은 전 세계에서 사용되는 주요 항생제 중 가장 많이 소비되는 항생제이다. 분뇨를 통해 70% 이상 배출되며 반감기와 독성이 다른 주요 항생제에 비해 수십배 높다. 이에 CTC은 가축분뇨 내 잔류하여 분뇨의 혐기성 소화 시 부작용을 일으킬 가능성이 가장 높은 항생제로 예상된다. 또한 CTC은 3개의 작용기를 가지며 2가 양이온과 chelate 결합하는 이온성 물질이다. 환경 조건에 따라 존재형태가 달라지고 항생작용의 정도 (내성 유전자의 발현, 세포 내 축적, 독성 등)를 달리한다. 그러므로 가축 분뇨 내 존재하는 CTC의 존재형태를 고려하여 혐기성 소화 과정에 미치는 영향 및 가능성에 대한 연구가 필요하다. 가축분뇨의 혐기성 소화 중 CTC의 영향과 혐기성 소화 조건에 따른 존재형태의 영향 가능성에 대한 연구는 추후 혐기성 소화 과정에서 분뇨 내 항생제의 환경영향 평가에 기준 자료로서 활용될 수 있다.

본 연구에서는 가축분뇨 중 단독 소화 비율이 가장 높은 우분을 대상으로 하여 CTC의 존재형태를 중심으로 혐기성 소화에 미치는 영향 연구를 수행하였다. 우선 혐기성 소화 중 기질의 변화 및 소화 결과를 단편적으로 관찰하기 위해 회분식 실험을 통해 CTC 농도에 따른 유기물 감량 및 바이오 가스 (메탄, 이산화탄소) 발생량 변화를 조사하였다. 기질로서 항생제를 사용하지 않고 사육된 한우의 분뇨를 채취하여 사용하였다. 샘플링 날짜 별 동일한 조건의 실험을 셋팅하여 샘플을 채취함으로써 실험 진행에 따라 유기물 감량의 변화와 소화 환경 조건 변화를 관찰하고자 하였다. 또한 CTC의 존재형태에 따른 메탄 발생 저해를 관찰하기 위해  $Mg^{2+}$ 의 농도, pH를 달리하여 specific methanogenic activity (SMA) test를 진행하였다. 각 조건의 존재형태는 Visual MINTEQ software를 통해 확인되었다. 조건 별 CTC의 존재형태를 변수군으로 적용하고, 메탄 발생량 차이를 종속 변수로 하여 다중회귀분석을 수행하였다. 이를 통해 CTC의 존재형태 중 메탄 발생 저해에 미치는 기여도를 구분하고자 하였다. 마지막으로 혐기성 소화조 수용액 상 환경 조건에서 CTC의 존재형태를 예측하고 CTC에 의한 저해 영향 발생 가능성을 평가하였다.

회분식 실험을 통해 25, 50, 100 mg-CTC/L의 조건에서 대조군 대비 각각 90, 80, 80% 의 메탄이 발생하고, 분뇨 내 잔존할 것으로 예상되는 농도 (10 mg-CTC/L)에서는 메탄 발생에 저해가 일어나지 않는 것을 확인하였다. 고상 유기 탄소의 측정오차가 유기 탄소 감량률 차이보다 커 CTC 농도에 따른 유기 탄소 감량률은 비교하지 못하였다. 하지만, 용존 유기 탄소 및 SCOD 변화를 통해 가수분해가 속도 결정 단계로 진행되었음을 확인하였다. 이를 근거로 메탄 발생량을 이용해 가수 분해 속도 상수를 결정하고 비교한 결과, CTC 농도 증가에 따라 가수분해가 저해

되는 것으로 나타났다. 또한 CTC 농도 증가에 따른 메탄과 이산화탄소의 발생 물비율을 비교함으로써 메탄 생성 과정 중 acetogenotrophic methanogenesis가 hydrogenotrophic genesis 보다 CTC의 저해를 받는 메탄 생성 과정임을 파악하였다. SMA test를 통해 금속결합 1가 양이온 CTC와 양쪽성이온 형태의 CTC가 메탄 발생 저해에 가장 기여도가 높은 존재형태임을 확인하였다. 이는 세포막 투과 및 항생 작용에 유리한 것으로 알려진 존재형태와 같다. 여러 가지 2가 금속 양이온 중  $\text{Cu}^{2+}$ 가 CTC 존재형태에 가장 큰 민감도를 나타내었다. 그 이유는  $\text{Cu}^{2+}$ 와 CTC의 결합상수가 다른 금속 양이온에 비해 1,000 - 1,000,000 배 크기 때문이다. 이에 대부분의 CTC는 분뇨 내  $\text{Cu}^{2+}$ 에 의해 금속 결합 중성 CTC로 존재할 것으로 예상된다. 유기산으로 부터의 음이온은 영향을 거의 미치지 않았다. 결론적으로, 우분 내 존재할 것으로 예상되는 CTC의 농도와 우분의 액상 내 존재하는  $\text{Cu}^{2+}$  농도, 그리고 중성 이상의 pH를 고려하면, 우분의 혐기성 소화 중 메탄 발생 저해는 발생하지 않을 것으로 판단된다. 본 연구에서 평가한 저해 농도 이하로 잔류하며 대부분 저해 영향이 미미한 금속 결합 중성 CTC로 존재할 것이기 때문이다. 하지만 혐기성 소화 중 CTC의 흡수 및 작용에 미치는 고상의 영향을 확인하지 않은 한계가 있고 CTC의 장기노출 시 메탄 발생의 저해 농도가 낮아질 수 있다. 따라서 연속식 반응조를 이용해 장기노출의 효과와 혐기성 소화 환경 인자를 모두 고려한다면 우분의 혐기성 소화에 미치는 CTC의 영향 효과 및 가능성을 더욱 정확하게 판단할 수 있을 것이다.

주요어 : 혐기성 소화, 우분, 항생제, chlortetracycline, 메탄

학 번 : 2015-22932

# 목 차

제 1 장 서론 .....	1
제 1 절 연구의 배경 .....	1
제 2 절 연구의 목적 .....	5
제 3 절 연구의 범위 .....	6
 제 2 장 문헌 연구 .....	8
제 1 절 혐기성 소화 .....	8
2.1.1. 혐기성 소화 개념 .....	8
2.1.2. 혐기성 소화 과정 .....	10
제 2 절 Tetracycline .....	13
2.2.1. Tetracycline의 종류 및 물리화학적 특성 .....	13
2.2.2. Tetracycline의 흡수 및 작용 기작 .....	18
2.2.3. Tetracycline의 흡수 및 작용 영향인자 .....	20
2.2.4. 분뇨 내 Tetracycline 잔존 농도 .....	23
 제 3 장 실험재료 및 방법 .....	24
제 1 절 실험 재료 .....	24
3.1.1. 기질 및 식종슬러지 .....	24
3.1.2. Chlortetracycline (CTC) .....	25
3.1.3. 기타 실험 재료 .....	26

제 2 절 회분식 중온 혐기성 소화 실험 .....	27
3.2.1. 실험 방법 .....	27
제 3 Specific Methanogenic Activity Test .....	29
3.3.1 실험 방법 .....	29
제 4 절 분석 방법 .....	31
3.4.1. 물리화학적 성상 분석 .....	31
3.4.2. 바이오 가스 분석 .....	34
3.4.3. 탄소 분석 .....	36
3.4.4. Chlortetracycline 존재형태 분석 .....	36
 제 4 장 실험결과 및 분석 .....	 39
제 1 절 기질 및 식종슬러지의 물리화학적 성상 .....	39
4.1.1. 액상 수질 분석 .....	39
4.1.2. 금속 양이온 농도 .....	40
4.1.3. 총 탄소 및 유기탄소 분석 .....	41
제 2 절 회분식 중온 혐기성 소화 실험 .....	42
4.2.1. 유기물 감량 변화 .....	42
4.2.2. 메탄 발생량 비교 .....	48
4.2.3. 가수분해 속도 비교 .....	50
4.2.4. Methanogenesis 영향 .....	52
4.2.5. 기타 저해인자 및 소화 조건 차이 확인 .....	54
제 3 절 Specific Methanogenic Activity Test .....	56
4.3.1. 메탄 발생량 비교 .....	56
4.3.2. Chlortetracycline 존재형태 분석 .....	58

4.3.3. 다중회귀 분석 .....	60
4.3.4. Chlortetracycline에 의한 저해영향 발생 가능성 평가 .....	62
 제 5 장 결론 .....	 67
 참고문헌 .....	 69
Abstract .....	78



## 표 목 차

표 2-1. 혐기성 소화의 장점 및 단점 .....	9
표 2-2. Tetracycline 계열 주요 종류 .....	15
표 2-3. Tetracyclines의 물리화학적 특성 .....	17
표 3-1. 우분과 슬러지의 삼성분 분석 결과 .....	25
표 3-2. Chlortetracycline hydrochloride의 특성 .....	26
표 3-3. 우분 중온 소화 회분식 혐기 반응조 실험 조건 .....	28
표 3-4. SMA test 반응조 실험 조건 .....	30
표 3-5. 바이오 가스 조성 측정을 위한 Gas Chromatography 조건 .....	35
표 3-6. Chlortetracycline의 해리상수 및 금속양이온과의 결합상수 .....	38
표 4-1. 우분과 혐기소화 슬러지의 액상 수질 분석 결과 .....	39
표 4-2. 우분과 혐기소화 슬러지의 금속 양이온 농도 .....	40
표 4-3. 우분과 혐기소화 슬러지의 총 탄소 및 유기탄소 함량 .....	41
표 4-4. 고상의 순 탄소 변화량 계산 및 고상 유기탄소 측정오차 .....	45
표 4-5. 메탄발생량을 통해 산정한 CTC 농도 별 가수분해 속도 상수 .....	51
표 4-6. 대조군 대비 상대적인 메탄 및 이산화탄소의 발생량 및 몰비 .....	53
표 4-7. pH 및 $Mg^{2+}$ 농도를 고려한 CTC 존재형태 .....	59
표 4-8. 변수군 (A)로부터 얻어진 회귀방정식의 주요 계수 및 인자 .....	61
표 4-9. 양이온 및 음이온 종류, 농도에 따른 CTC 존재 형태 변화 .....	63

## 그 립 목 차

그림 1-1. 미국 내 가축용 항생제 및 식품용 가축 생산 변화율 .....	2
그림 1-2. 2014 년 미국 내 허가 가축용 항생제 8 종 판매량 .....	3
그림 2-1. 유기물의 혐기성 소화 과정 .....	12
그림 2-2. 항생효과를 위한 tetracycline의 치환 및 구조화학적 요건 ...	16
그림 2-3. 그람 양성 및 음성균의 세포벽 단면도 .....	20
그림 2-4. Tetracycline의 작용 기작 .....	20
그림 2-5. 분뇨 내 tetracyclines의 예상 잔존 농도 .....	24
그림 3-1. 회분식 반응조의 단면도 .....	28
그림 3-2. SMA test 반응조 단면도 .....	31
그림 4-1. 초기 및 소화 30일 후 총 유기탄소 분배 분석 결과 .....	44
그림 4-2. 30일 소화 기간 동안의 용존 유기탄소 변화 .....	48
그림 4-3. 30일 소화기간 동안의 SCOD 변화 .....	48
그림 4-4. CTC 농도 별 누적 메탄 발생량 .....	50
그림 4-5. 샘플링 시간 별 pH 및 free ammonia 농도 변화 .....	56
그림 4-6. 샘플링 시간 별 FOS/TAC ratio 및 알칼리도 변화 .....	56
그림 4-7. SMA test 조건 별 메탄 발생량 .....	58
그림 4-6. $Mg^{2+}$ 및 $Cu^{2+}$ 농도에 따른 CTC 존재 형태 농도를 고려한 예상 상대적 메탄 발생량 .....	67

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구의 배경

공장식 가축 사육방식의 증가로 인해 급증한 가축분뇨의 효율적인 처리에 대한 필요성이 증대되고 있다. 2015 년 한 해 동안 미국에서 335백만 톤의 가축분뇨가 발생하였으며, 이는 전체 유기성 폐기물 발생량 부피의 62%에 해당한다 (Linville et al., 2015). 고형 연료화, 퇴비화, 혐기성 소화 등 가축 분뇨 처리 방법 중 혐기성 소화는 경제적이고 친환경적인 방법으로 활용되고 있다. 혐기성 소화는 산소가 존재하지 않는 환경에서 혐기성 미생물이 유기물을 이용해 대사하고 최종산물로서 메탄과 이산화탄소를 발생시키는 과정이다. 다른 처리방식에 비해 슬러지 부피 감량률이 50% 이상 높고, 밀폐된 반응조를 이용하므로 악취 발생이 적다 (송민경, 2009). 또한 최종산물로 발생한 바이오 가스를 발전시켜 443 kWh/ton (by dry wt.)에 해당하는 전기를 생산할 수 있고, 퇴비화 과정 대비 약 258 kg CO<sub>2</sub>/ton (by dry wt.)의 온실가스 배출을 저감할 수 있다 (Eduardo et al., 2015).

축산업에서는 생장 촉진 목적과 질병 치료의 목적으로 수많은 종류와 많은 양의 가축용 항생제가 사용된다. 2010 년, 63,200 톤의 가축용 항생제가 소비되었다. 이는 매년 전 세계적으로 생산되는 항생제 무게의 약 3분의 2에 해당한다. 2009 년부터 2014 년까지 미국 내 식품용 가축 생산량은 거의 변하지 않은 반면, 가축용 항생제의 사용량은 25% 이상 증가하였다 (그림 1-1). 이렇게 사용된 항생제의 총량 중 20% 에서 90%는 가축의 분뇨를 통해 배출된다 (Boxall et al., 2004). 혐기성 소화는 혐기

성 미생물이 유기물을 활용하는 일련의 생물학적 처리 과정이므로, 분뇨 내 항생제는 가축분뇨 처리과정에서 부작용을 일으킬 수 있다.

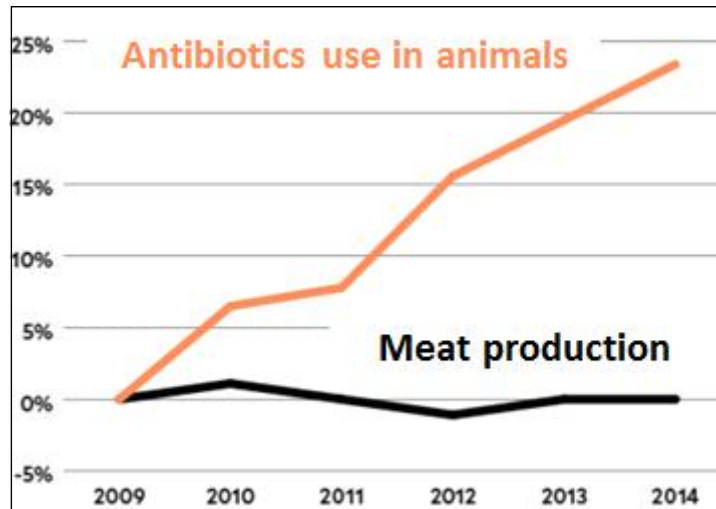


그림 1-1 미국 내 가축용 항생제 및 식품용 가축 생산 변화율 (Gelband et al., 2015)

Tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) 그리고 doxytetracycline 등을 포함하는 테트라사이클린 계열 (Tetracyclines, TCs)은 미국내 허용된 10 종의 항생제 중 가장 많이 소비되는 주요 항생제 계열이다 (그림 1-1). 경구 복용의 용이성, 낮은 가격, 광범위한 항생제 효과의 장점을 가지고 있다 (FDA, 2015). 그 중 CTC는 70% 이상의 배출율을 나타낸다 (Kumar et al., 2005). 다른 주요 항생제의 반감기가 8 - 17 일 인데 반해, CTC는 77 일 이상의 반감기를 가진다 (Chenxi et al., 2008). 또한 독성 실험결과, 혐기성 미생물에 대해 다른 주요 항생제 대비 수백 배의 독성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Kummerer et al., 2004). 이에 따라 CTC는 가축용 항생제 중 혐기소화에 미치는 영향이 가장 클 것으로 예상되는 종이다 (Fountoulakis

et al., 2008).

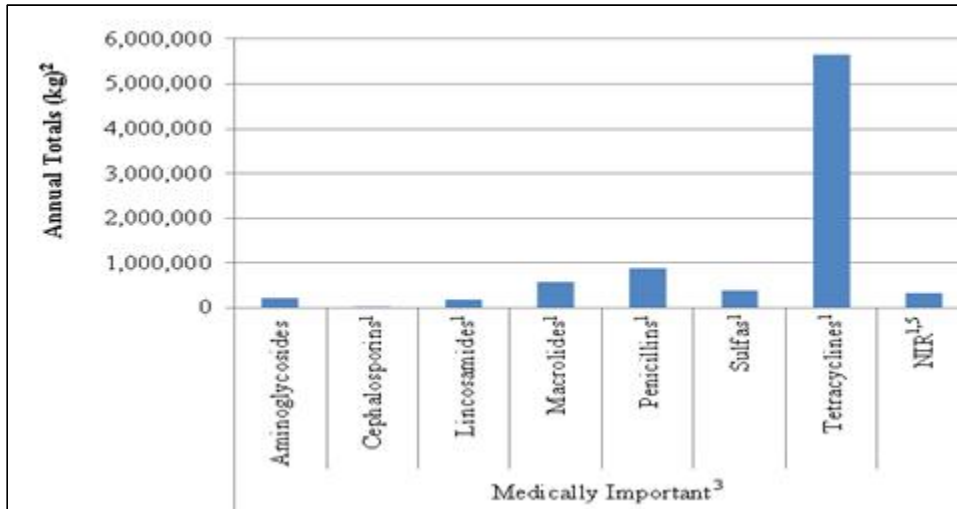


그림 1-2 2014 년 미국 내 허가 가축용 항생제 8 종 판매량 (FDA, 2015)

축산업이 발달한 미국 및 유럽의 주요 국가는 대부분 우분의 혐기소화 비율이 높다. 미국의 경우, 농장 기반 혐기 소화조 수의 81%가 우분을 단독기질로 처리하고 있는 실정이다 (EPA, 2016). 또한 혐기소화의 활용이 보편화된 유럽의 경우 농장 기반의 혐기소화조 정책 수립 및 적용에 있어 우분 처리의 필요성을 강조한 바 있다 (Cave, 2013). 그러므로 항생제의 가축 분뇨 혐기소화에 미치는 영향을 파악하기 위해서 CTC와 우분을 우선 고려할 필요가 있다.

또한 CTC는 환경 조건에 따라 항생작용의 정도 및 거동을 달리한다. 3개의 작용기를 가지며 2가 양이온과 chelation 결합하는 이온성 물질이기 때문이다 (Schnappinger and Hillen, 1996). pH, 2가 양이온의 농도와 종류 등에 따라 세포 내 축적되는 항생제의 양, 발현되는 내성 유전자의 수 그리고 독성이 달라지는 것으로 보고된 바 있다 (Zhang et al., 2014 (a); Pulicharla et al, 2015).

현재 국내외에서는 혐기성 소화에 유입되는 분뇨 내 항생제 농도에 대한 특별한 규제 기준이 없고 저해요인으로써 인식되지 않고 있는 실정이다. 하지만 사용량, 잔존성, 독성 등을 고려할 때, 분뇨 내 CTC가 혐기성 소화에 미치는 영향에 대한 연구가 수행되어야 한다. 또한 소화 환경 조건에 따른 CTC의 존재형태 및 항생작용의 변화를 고려한 영향 평가가 필요하다.

## 제 2 절 연구의 목적

본 연구에서는 가축용 항생제 중 분뇨 내 잔존할 시 혐기성 소화에 가장 영향이 클 것으로 예상되는 CTC가 우분의 혐기성 소화에 미치는 영향에 대해 연구하고자 하였다. 또한 주변 환경 조건을 고려한 영향 변화에 대해 연구하고자 하였다. 대상 가축분뇨는 단독소화조의 운영비율이 가장 높은 우분으로 하였다. 이를 위한 세부 연구 목표는 다음과 같다.

- 1) 우분의 혐기소화 과정에서 CTC의 농도 변화에 따른 유기물 감량을 및 바이오가스 (메탄, 이산화탄소) 발생량 조사
- 2) pH 및 2가 양이온 농도 변화를 통해 CTC의 존재형태 중 혐기성 소화에 영향에 기여도가 높은 형태 결정
- 3) 혐기소화조 환경을 고려한 CTC의 존재형태 예측과 이를 통한 유기물 감량 및 바이오가스 발생에 미칠 영향 가능성 평가

### 제 3 절 연구의 범위

연구 목적 달성을 위해서 대상 가축 분뇨는 항생제가 주입되지 않은 소에서 발생한 우분으로 선정하였다. 또한 혐기성 소화를 통한 기질의 변화 및 소화 결과를 소화 진행에 따라 단편적으로 관찰하기 위해 회분식 실험을 선택하였다. 본 연구에서 수행하고자 하는 연구의 범위는 다음과 같다.

#### 1) 중온 회분식 실험

우분의 중온 혐기성 소화 실험을 통해 혐기성 소화 과정 중 CTC가 유기물 감량을 및 바이오 가스 (메탄 및 이산화탄소) 발생량에 미치는 영향을 조사하였다. 기질의 분해 과정을 관찰하기 위해 동일한 조건의 회분식 실험조를 샘플링 날짜별로 설치하여, 샘플을 확보하였다. 이를 통해 혐기성 소화가 진행됨에 따라 변하는 고상 및 액상 내 유기탄소 농도 및 양을 확인하였다. 또한 메탄과 이산화탄소의 양, 조성을 분석하여 발생량과 발생 경향을 확인하였다. 메탄 발생량 경향을 통해 가수분해 속도 상수를 도출하였다.

#### 2) Specific Methanogenic Activity (SMA) test

환경 조건 변화에 따른 혐기성 소화의 영향 변화를 확인하기 위해, OECD 표준방법인 SMA test를 진행하였다. 가장 단순한 유기산인 아세트산을 기질로 사용하고, 총 고형물의 농도 0.1% (by wet wt.)를 조성하



여 SMA test가 진행하였다. CTC의 존재형태에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려진 pH 및 2가 양이온을 환경 조건 변수로 선정하였다. 실험에서는 2가 양이온으로 자연계에 보편적이며, 혐기소화에 영향이 적은 것으로 알려진  $Mg^{2+}$ 를 사용하였다. 혐기성 소화에 미치는 영향의 대표인자로 메탄 발생량을 선정하여 환경 조건에 따른 차이를 비교하였다.

### 3) 다중회귀분석

SMA test를 통해 확인한 pH,  $Mg^{2+}$  농도 변화에 따른 CTC의 메탄 발생 저해영향 변화를 설명하기 위해 다중회귀분석을 수행하였다. 조건 별 CTC 존재형태의 농도를 변수군으로 하고 메탄 발생 차이를 종속 변수로 적용하였다. 조건 별 CTC 존재형태는 Visual MINTEQ software를 통해 확인하였다.

### 4) CTC에 의한 저해영향 발생 가능성 평가

혐기성 소화조 환경 조건 사례 조사 및 조건 변화에 따른 저해영향 예측결과를 통해 우분의 혐기성 소화 중 CTC의 존재형태를 예측하고, CTC에 의한 저해영향 발생 가능성을 평가하였다.

## 제 2 장 문헌 연구

### 제 1 절 혐기성 소화

#### 2.1.1. 혐기성 소화 개념

혐기성 소화 (anaerobic digestion)는 혐기성 조건에서 혐기성 미생물이 유기물을 전자 수용체 및 전자 공여체로 하여 대사하는 일련의 과정을 의미한다. 이 과정에서 유기물은 가수분해 (hydrolysis), 산생성 (acidogenesis), 아세트산생성 (acetogenesis), 메탄생성 (methanogenesis)의 단계를 거쳐 최종적으로 메탄, 이산화탄소, 물 등으로 변환된다. 혐기성 (anaerobic)이란 유리산소와 결합산소 모두 존재하지 않는 조건을 의미하며, 유리산소는 존재하지 않지만 결합산소가 존재하는 무산소 조건 (anoxic)과 구분된다 (Gunaseelan, 1997; Monnet, 2003; 송민경, 2009; Abbasi et al., 2012).

산업, 환경 분야에서 혐기성 소화는 생물학적으로 분해 가능한 유기성 폐기물의 처리와 바이오가스, 퇴비와 같은 유용한 물질 생산을 목적으로 활용된다. 혐기성 소화의 장점은 높은 슬러지 감량률, 고농도의 폐수 및 고형 폐기물 처리, 유기성 폐기물의 안정화, 악취 제어, 바이오가스를 통한 에너지 생산 등이다. 단점에는 환경 변화에 취약한 메탄 생성균 활성화, 초기 안정화에 필요한 소요시간, 초기 시설 비 등이 있다 (표 1-1).

표 2-1 혐기성 소화의 장점 및 단점 (Reith et al., 2003)

Advantages	Disadvantages
<ul style="list-style-type: none"> <li>* High reduction rate of sludge; up to 90% by volatile solids wt.</li> <li>* Handle high loads of organic waste and wastewater → the space requirements are low</li> <li>* Almost complete retention of the fertiliser nutrients nitrogen (N), phosphate (P) and potassium (K)</li> <li>* Raw waste stabilization</li> <li>* Odor control by closed system</li> <li>* Biogas generation for energy sources</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* High sensitivity of methanogenic bacteria to changes of environmental conditions → high risks of reactor failure</li> <li>* Initial stabilization for operation can be time-consuming process</li> <li>* high initial construction costs</li> </ul>

### 2.1.2. 혐기성 소화 과정

혐기성 소화 과정 동안 유기물은 가수분해, 산생성, 아세트산생성, 메탄생성의 네 단계에 관여하는 다양한 미생물 군집에 의해 분해된다. 각 단계에 관여하는 주요 미생물 그룹과 생산, 소비되는 기질의 흐름을 그림 2-1에 나타내었다.

가수분해 과정을 통해 탄수화물, 단백질, 지방과 같은 입자성 유기물이 다당류, 아미노산, 지방산과 같은 수용성 단위체, 이합체로 분해된다. 이 과정에서 Hydrolytic bacteria는 가수분해효소 (amylases, proteases, and lipases)를 세포외로 발생시켜 입자성 유기물의 표면에서 가수분해를 일으킨다 (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991). 또한 입자성 물질의 가수분해는 물리화학적 반응에 의해서도 발생한다. 혐기성 소화에서 셀룰로오스와 같은 난분해성 고분자물질의 가수분해는 난분해성 고분자물질의 비율, 분해 조건에 따라 속도 결정단계로 작용한다. (Khalid et al., 2011).

산생성 과정에서 acidifying bacteria는 가수분해 과정을 포함하여, 용존성 유기물을 short-chain organic acids (formic, acetic, propionic, butyric, and pentanoic), 알코올 (methanol, ethanol), 알데하이드, 이산화탄소, 수소로 변환시킨다 (Kayode and Jude, 2015). 또한 단백질의 분해를 통해 혐기성미생물의 에너지원인 아미노산과 펩티드가 발생시킨다. 산생성균은 일반적으로 facultative anaerobes 와 obligatory anaerobes로 이루어져 있으며 protozoa, fungi 등도 보고된 바 있다 (Toerien and Hattingh, 1969).

아세트산생성 과정에서 fermentative bacteria에 의한 용존성 유기물의 분해 그리고 acetate-forming bacteria에 의한 유기산의 분해를 통해 수

소와 아세트산이 발생한다. 약 70%의 메탄이 아세트산의 전환으로 발생하므로 아세트산 생성과정은 바이오 가스 발생에 가장 비중이 큰 단계이다. 이에 아세트산 농도 또는 아세트산과 유기산 농도의 비율은 혐기성 소화 반응조의 안정성 판단 지표로 활용 된다 (Kim, 2016).

메탄생성 과정은 가수분해, 산생성, 아세트산생성 과정을 통해 발생한 부산물인 아세트산, 수소, 이산화탄소, 메탄올, 메틸아민 등이 methanogenic bacteria에 의해 메탄과 이산화탄소로 전환되는 과정이다. 약 70%의 메탄이 아세트산으로부터 발생 (acetotrophic methanogenesis)하며 약 30%의 메탄이 수소, 이산화탄소로부터 발생 (hydrogenotrophic methanogenesis)한다. Hydrogenotrophic methanogenesis에 의한 메탄발생 비중은 작지만, hydrogenotrophic methanogenesis는 반응조 내 용존 수소 농도 유지를 통해 산생성, 아세트산 생성균의 활성화, 성장을 유지시키므로 중요한 단계이다. Methanogenic bacteria는 혐기성 소화 미생물 중 pH, 유기물 부하, 온도 등 운전 조건 변화에 가장 민감하다 (Amani et al., 2010; Kayode and Jude, 2015; Kim 2016).

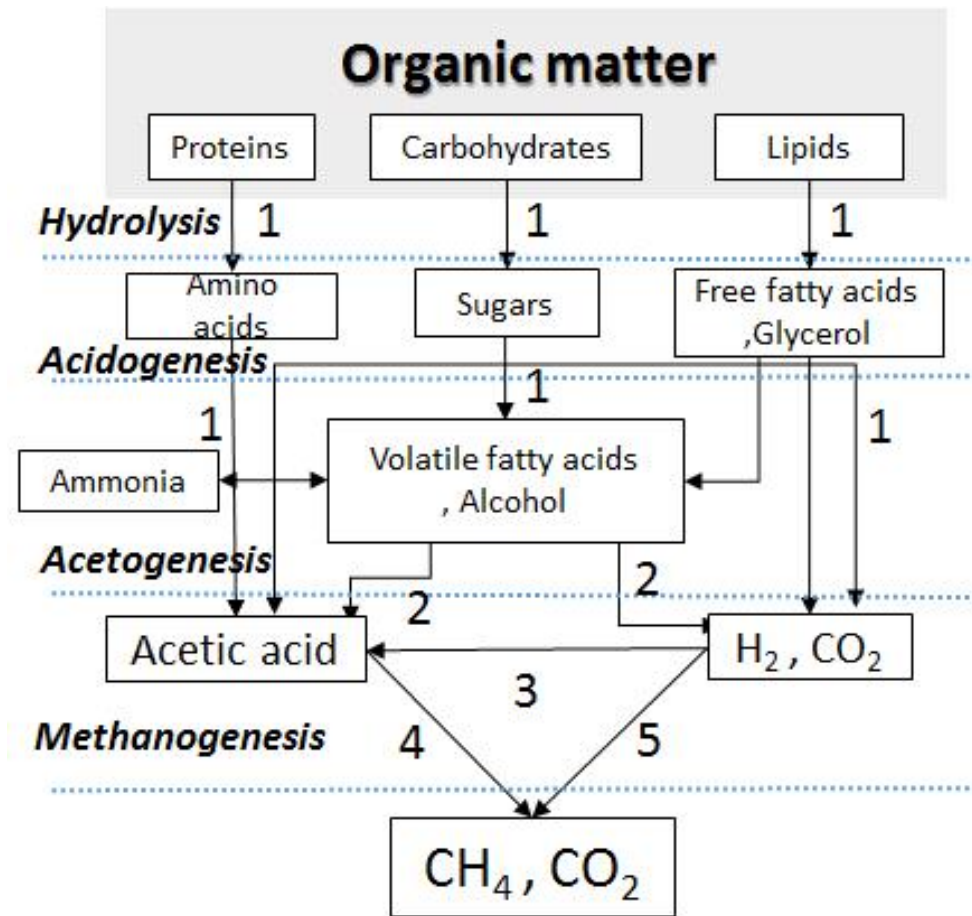


그림 2-1 유기물의 혐기성 소화 과정 : 1 fermentative bacteria; 2 hydrogen-producing acetogenic bacteria; 3 hydrogen-consuming acetogenic bacteria; 4 carbon dioxide-reducing aceticlastic methanogens; 5 carbon dioxide-reducing methanogens (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 2009)

## 제 2 절 Tetracycline

### 2.2.1. Tetracyclines의 종류 및 물리화학적 특성

Tetracyclines (TCs)는 1940년대에 발견되어, 현재 전 세계에서 가장 많이 사용되는 항생제 계열이다. 낮은 가격과 적은 부작용, 그리고 광범위한 항생효과를 바탕으로 인간과 가축의 질병 치료목적으로 사용되고 있다. 유럽에서는 가축의 성장촉진 목적의 사용을 금지하였지만, 미국에서는 허용되어 사용된다 (Chopra and Roberts, 2001). CTC는 TCs 계열 중 *Streptomycine aureofaciens*로 부터 1948 년 최초로 생산된 종류이다. TCs의 주요 종류 및 이름을 표 2-2에 정리하였다.

TCs는 선형으로 연결된 4 개의 탄소 고리를 모체로 하여 여러 가지 작용기가 부착된 형태이다. 작용기의 치환에 따라 각기 다른 종류로 분류되어 사용된다. 항생작용이 유지되기 위해서는 선형으로 연결된 탄소 고리의 유지, 4a, 12a (A-B 고리 연결) 위치의 (α) 입체 배열, 4-dimethylamino group, 11, 12 와 12a 위치의 keto-enol system 유지가 요구된다 (Chopra and Roberts, 2001; Daghrir and Drogui, 2013). 본 연구에서 사용된 CTC은 TCs의 모체에서 7번 탄소에 Cl 이온이 치환된 형태이다 (그림 2-2).

CTC, OTC 및 TC의 분자식과 화학 구조, 각종 물리화학적 성질을 표 2-3에 정리하였다. 위의 TCs는 낮은 Henry's constant ( $3.35 \times 10^{-24}$  to  $3.91 \times 10^{-26}$  atm\*m<sup>3</sup>/mol)로 휘발성이 낮다. 그리고 친수성과 소수성 모두 나타내는 것으로 알려져 있지만, 친수성에 가까운 성질 (용해도 : 0.008 to 0.062 mol/L; octanol-water 분배계수 (logK<sub>OW</sub>) : -1.25 to -1.12 )을 나타낸다. 또한 세 개의 이온화 작용기로 인해 세 개의 pK<sub>a</sub> 값을 가진다. 일반적으로 중성 pH 범위에서는 양쪽성 이온형태, pH 3

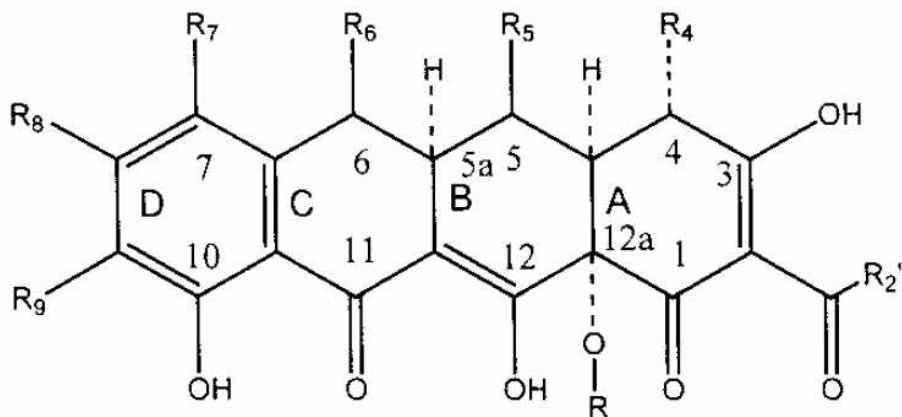
이하에서는 1가 양이온 형태, pH 8 이상에서는 1가 및 2가 음이온 형태가 지배적인 것으로 알려져 있다 (Chopra and Roberts, 2001; Daghrir and Drogui, 2013; Gaugain et al., 2015).

이온화하는 3 개의 작용기를 가진 TCs는 자연계에 2가 금속 양이온 (e.g.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ )과 chelate 결합을 하여 전기적으로 안정화된다. 금속 chelate 결합은 금속 양이온의 양전하부가 대상 물질의 전자공여체 음전하 부와 짝게 형태로 공유 결합하는 것을 의미한다. 주로 1 - 3 번 탄소의 tricarbonylamide group, 4 번 탄소의 dimethylamino group, 10, 11, 12번 탄소의 phenolic diketone group에서 chelate 결합이 형성된다. TCs의 금속 chelate 결합은 물리화학적 특성을 변화시켜 토양, 하수처리장 슬러지 등 자연계에서의 거동과 독성, 항생제 내성균 발현 등에 영향을 미친다. (Sompolinsky and Samra, 1972; Cook et al., 1993 Zhao et al., 2014; Tong et al., 2015). TCs의 금속 결합에 따른 특성 변화에 대한 문헌 연구는 2.2.3에서 다루었다.



표 2-2 Tetracycline 계열 주요 종류 (Chopra and Roberts, 2001)

Chemical name	Generic name	Trade name	Year of discovery	Status
7-Chlortetracycline	Chlortetracycline	Auremycine	1948	Marketed
5-Hydroxytetracycline	Oxytetracycline	Terramycine	1948	Marketed
Tetracycline	Tetracycline	Achromycin	1953	Marketed
6-Demethyl-7-chlortetracycline	Demethylchlortetracycline	Declomycin	1957	Marketed
2-N-Pyrrolidinomethyltetracycline	Rolitetracycline	Reverin	1958	Marketed
2-N-Lysinomethyltetracycline	Limecycine	Tetralysal	1961	Marketed
N-Methylol-7-chlortetracycline	Clomocycine	megaclor	1963	Marketed
6-methylene-5-hydroxytetracycline	Methacycline	Randomycine	1965	Marketed
6-Deoxy-5-hydroxytetracycline	Doxycycline	Vibramycin	1967	Marketed
7-Dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline	Minocycline	Minocin	1972	Marketed
9-(t-butylglycylamido)-minocycline	Tertiary-butylglycylamidominocycline	Tigilcycline	1993	Phase II clinical trials



Rings (A-B-C-D) = linear-fused rings

Rings (D-C-B) C-10, C-11, C-12 = phenolic ketoenol system

Ring (A) C-1, C-2, C-3 = tricarbonyl-type keto-enol system

R<sub>5</sub> = H (tetracycline)

R<sub>7</sub> = H (tetracyclines), Cl (chlortetracyclines) or dialkylamino (minocycline-type) or NO<sub>2</sub>

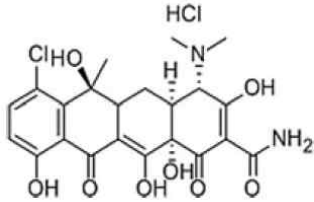
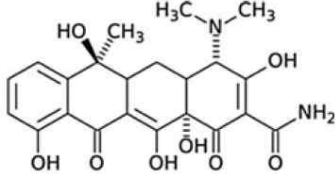
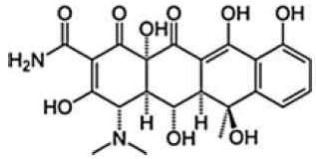
R<sub>8</sub> = H

R<sub>9</sub> = glycylamido

R<sub>12a</sub> = H

그림 2-2 항생효과를 위한 tetracycline의 치환 및 구조화학적 요건 (Chopra and Roberts, 2001)

표 2-3 Tetracyclines의 물리화학적 특성 (Daghrir and Drogui, 2013)

Molecule	Molecular formula	Chemical structure	Molecular weight (g/mol)	Solubility (mol/L)	LogK <sub>OW</sub>	Henry's law constant (atm* m <sup>3</sup> /mol)	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>
Chlortetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		478.8	0.008	-0.62	3.45E-24	3.3 ± 0.3	7.55 ± 0.02	9.3 ± 0.3
Tetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		480.9	0.041	-1.25	-	3.2 ± 0.3	7.78 ± 0.05	9.6 ± 0.3
Oxytetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>		496.9	0.062	-1.12	3.91E-26	3.2 ± 0.3	7.5 ± 0.03	8.9 ± 0.3

### 2.2.2. Tetracyclines의 흡수 및 작용 기작

박테리아에 의한 TCs의 흡수 기작은 그람 양성 및 음성균의 세포벽 특성 차이로 인해 다르다 (Guzman et al., 2012). 그람 양성균의 세포는 두꺼운 peptidoglycan 세포벽과 plasamic membrane 그리고 내부의 cytoplasmic space로 구성되어 있다. 그람 음성균의 세포는 내부의 cytoplasmic space를 얇은 peptidoglycan 세포벽, 그리고 Lipoprotein 및 Lipopolysaccharide로 이루어진 두꺼운 외막이 둘러싼 구조이다 (그림 2-3). 그람 음성균의 외막은 이온평형을 위한 이온의 이동성을 의미하는 Donnan potential을 이용해 금속결합 1가 양이온 TCs ( $\text{MHTCs}^+$ )를 통과시킨다 (Chopra, 1985). 이후 TCs는 plasmic space의 환경에 의해 금속 이온과 해리되어 양쪽성 중성이온 TCs ( $\text{H}_2\text{TCs}^0$ )으로 존재한다. plasmic space내 양쪽성 중성이온 TCs는 확산을 통해 내부 cytoplasmic membrane을 투과한다. 반면에 그람 양성균의 plasmic membrane는 에너지 의존 방법인 pH 차에 의한 photon motive force를 통해 금속결합 및 이온상태의 TCs를 통과시킨다 (Nikaido and Thanassi, 1993; Schnappinger and Hillen, 1996). 세포 내 cytoplasmic space의 pH와 금속 양이온 농도는 세포 외부에 비해 매우 높은 것으로 알려져 있다. Cytoplasmic space로 흡수된 TCs는 금속결합 1가양이온 ( $\text{MHTCs}^+$ ) 또는 금속결합 중성 ( $\text{MTCs}^0$ ) TCs로 존재할 가능성이 높다 (Palm et al., 2008; White and Cantor, 1971).

Cytoplasmic space로 흡수된 TCs는 aminoacyl-tRNA가 ribosomal acceptor (A) 위치에 부착되는 것을 저해하여 박테리아의 단백질 형성을 막아 항생작용을 한다 (그림 2-4).

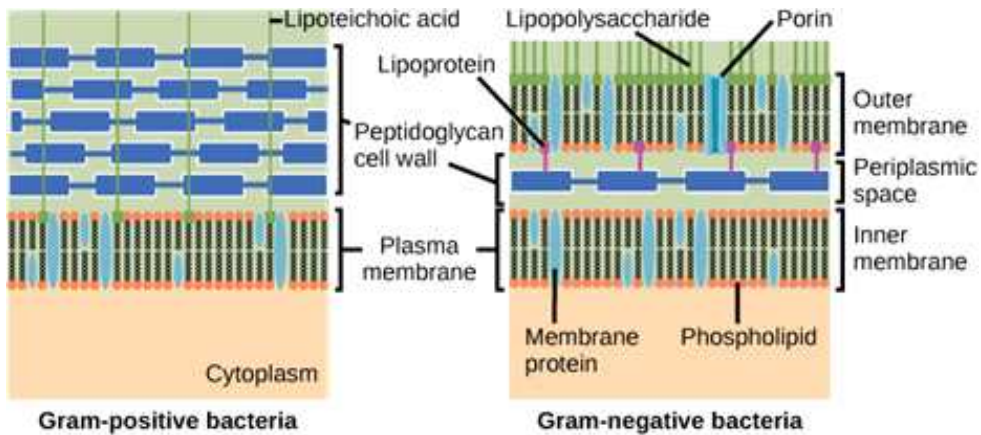


그림 2-3 그람 양성 및 음성균의 세포벽 단면도  
<https://cnx.org/contents/nnx1QFeU@11/Structure-of-Prokaryotes>

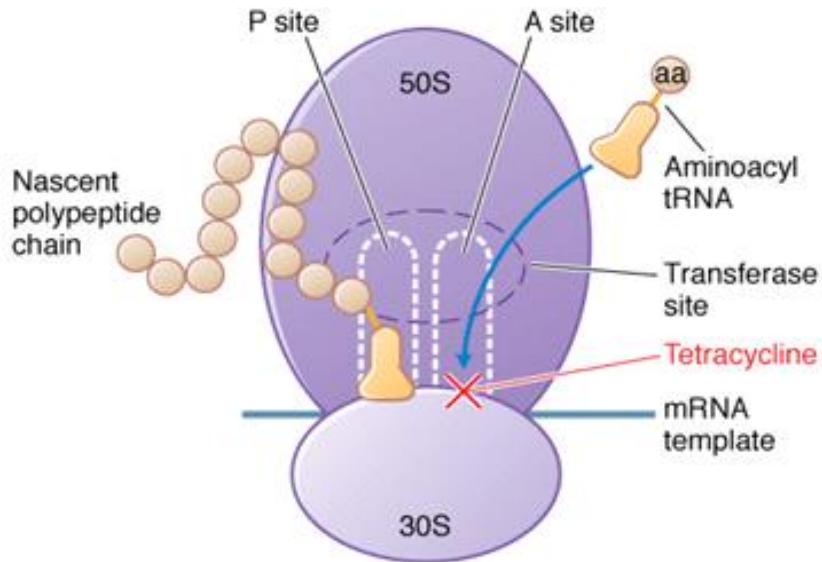


그림 2-4 Tetracyclines의 작용 기작  
<http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html>

### 2.2.3. Tetracyclines의 흡수 및 작용 영향인자

TCs가 박테리아와 같은 미생물에 미치는 영향은 흡수 (uptake)와 작용 (activity or toxicity)으로 표현된다. 흡수와 작용은 2.2.1, 2.2.2에서 서술한 바와 같이 TCs의 존재형태 (Chemical forms)에 따라 달라진다. TCs는 직접적으로 2가 금속 양이온과의 결합여부 및 pH에 따라 그 형태를 달리한다. 간접적으로 영향을 미치는 인자에는 자연계에 존재하는 음이온이 2가 양이온과 결합하려는 경쟁영향과 TCs의 고상 흡착 등이 있다. 본 연구에서는 현재까지 흡수와 작용의 명확한 관계가 밝혀지지 않았다는 Pulicharla (2017)의 연구결과에 근거하여, 두 개념을 구분하여 사용하였다.

#### 금속-CTC 결합

TCs는 2가 금속 양이온과 chelate 결합을 하므로 TCs가 존재하는 시스템 내 2가 양이온의 농도는 TCs의 흡수와 작용에 영향을 미친다. 자연계 및 분뇨 내 농도를 고려하였을 때,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 와 결합한 형태가 예상된다. 결합상수의 크기를 고려하였을 때는  $Cu^{2+}$ 와 결합한 형태가 예상된다 (Da silva and Dias, 1973; Carlotti et al., 2012). 현재까지의 문헌 조사 결과에 따르면, 금속 양이온과 TCs의 결합 여부가 박테리아에 의한 흡수에 미치는 영향에 대해 상반된 연구결과가 존재한다. Zhang (2014) (a)는  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ 의 농도가 0 mM에서 1 mM로 증가하였을 때, *E. Coli* (그람 음성균) 내 흡수된 CTC의 농도가 절반으로 줄어드는 것을 보고하였다. 반면에, Yamaguchi (1990) 과 Orth (1999)에 따르면, 2가 금속 양이온이 존재하지 않는 경우 *E. Coli* 내 TCs의 흡수는 확인되지 않았다. 또한 Orth (1999)는 2가 금속 양이온 결합체 중  $Co^{2+}$ ,

$Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  의 순서로 결합체의 흡수율이 높음을 보고하였다. 이는 chelation 결합의 해리상수가 작은 순서에 기인하는 것으로 예상된다. 금속결합 TCs이 TCs의 작용에 미치는 영향은 그람 양성 및 음성균에 따라 다르다. *Bacillus thuringiensis* (그람 양성균)은  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ -CTC 결합체에 대해 높은 독성영향을 받았지만, 다른 양이온 결합체는 독성영향이 양이온이 존재하지 않는 조건 대비 차이가 없었다. *Enterobacter aerogenes* (그람 음성균)은 양이온이 존재하지 않는 조건과  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ 가 존재하는 조건의 독성이 큰 차이를 나타내지 않았다 (Pulicharla et al., 2015).

## *pH*

2.2.1에서 서술한 바와 같이 TCs는 3 개의 작용기와 작용기별 각각 3.3, 7.4, 9.3의 pKa 값을 가지고 있기 때문에 pH에 따라 양이온, 양쪽성 이온, 음이온으로 존재형태를 달리한다. 그러므로 pH는 양이온 존재 하에 TCs의 양이온 결합 및 이온 상태를 결정할 수 있는 요인이다. *E. Coli*에 대한 pH에 따른 TCs의 흡수는 pH 증가에 따라 감소하는 경향이 나타났다 (Zhang et al., 2014 (a)). 하지만 pH에 TCs의 독성은 차이가 없는 것으로 보고된 바 있다 (Nanavaty et al., 1998).

## *자연계 음이온과 양이온 결합경쟁*

2가 금속 양이온은 수용액 상에서 TCs와 쉽게 결합하지만, 유기산으로부터 발생한 음이온과도 결합하므로 유기산의 음이온은 금속결합 상태 TCs 농도에 영향을 미칠 수 있다. Zhang (2014) (b)은 citric acid, oxalic acid, malonic acid, succinic acid, acetic acid 순으로 2가 양이온과 쉽게 결합하고, 금속결합 상태의 TCs 분율을 낮추어 *E. Coli* 내 TCs

의 흡수농도를 높인다고 보고하였다.

#### 고상흡착

TCs는 고상에 흡착함으로써 미생물로의 흡수, 작용 효과가 달라진다. 토양 및 고분자 유기물에 흡착됨으로써 수용액 상 TCs 농도가 감소하고 이에 따라 내성유전자 발현 및 성장 세포수가 감소된 연구 결과가 있다 (Chen et al., 2015; Pulicharla et al., 2015).



#### 2.2.4. 분뇨 내 Tetracycline의 잔존 농도

가축에게 사용된 TCs는 분뇨를 통해 배출된다. 현재까지의 문헌조사 결과, 0.01 mg/L에서 45 mg/L의 TCs가 분뇨 내 잔존하는 것으로 보고되었다 (그림 2-5). TCs 사용량과 분뇨로의 배출율, 그리고 분뇨 발생량을 통해 통계적으로 산정한 결과, 한국의 경우 약 1.5 mg/L (Kwon et al., 2015), 미국은 약 6 mg/L (Huang et al., 2014)의 TCs가 잔존하는 것으로 예상된다. 국제 표준 방법에 따라 경구 투여 하였을 시, 우분으로 배출되는 TCs의 농도는 약 10 mg/L에서 12 mg/L로 나타났다 (Arikan, 2008; Ince et al., 2013). 분뇨 더미 혹은 저장조 내에서는 TCs가 35 mg/L에서 45 mg/L까지 농축되어 검출된 바 있다 (Liguoro et al., 2003).

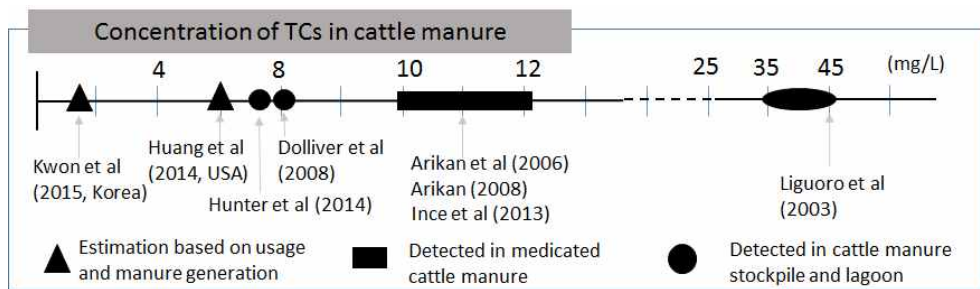


그림 2-5 분뇨 내 tetracyclines의 예상 잔존 농도

## 제 3 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절 실험 재료

#### 3.1.1. 기질 및 식종슬러지

본 연구에서는 혐기소화 기질로 우분을 사용하였고, 식종슬러지로 혐기소화 된 슬러지를 사용하였다. 우분은 서울대학교 평창캠퍼스 내에서 사육되는 10 개월 번식우 15 마리로부터 채취되었다. 분뇨 내 잔존하는 항생제가 없도록 항생제를 사용하지 않고 사육된 번식우의 축사를 선정하였다. 축사 내 분뇨 발생 장소에서 고르게 채취한 뒤 실험실에서 재혼합하였다. 볏짚과 같이 큰 헝겍물은 육안 선별을 통해 일부 제거 하였고, 균일한 성상의 시료를 제조하기 위해 믹서기에 갈아 한번 더 혼합하였다. 성상분석 및 실험에 사용하기 전까지 -4℃ 냉동고에 보관하였다. 식종슬러지는 서울의 J구 하수처리장 내 하수 슬러지, 분뇨, 음폐수 등을 기질로 하는 혐기소화조의 반출구에서 채취하였다. 혐기성 미생물의 활성저하를 최대한 방지하기 위해 실험 시작 7일 이내에 슬러지가 채취되었다. 0.5 mm 사이즈로 채거름하여 슬러지 내 이물질을 제거하였다. 성상분석 및 실험에 사용하기 전까지 4℃ 냉장고에 보관하였다. 폐기물 공정시험법에 따라 수행한 삼성분 분석을 통해 우분과 슬러지의 성상을 표 3-1에 정리하였다.

표 3-1. 우분과 슬러지의 삼성분 분석 결과

Proximate analysis (unit : wet wt. %)	Cattle manure (substrate)	Digested sludge (Inoculum)
Moisture	79.5 ± 0.2	97.7 ± 0.0
Volatile solids	15.1 ± 0.2	1.5 ± 0.0
Fixed solids	5.4 ± 0.1	0.8 ± 0.0

### 3.1.2. Chlortetracycline (CTC)

실험에 사용한 CTC은 Sigma-Aldrich (USA) 사의 Chlortetracycline hydrochloride (CAS no. 64-72-2)를 구매하여 사용하였다. hydrochloride 결합체는 보관의 안정성을 위해 결합된 상태로 존재하는 물질이며 수용액 상에 즉시 해리된다. 수용액 상태로 CTC를 용해시켜 사용하였으며, 이때 CTC의 농도는 hydrochloride의 분자량을 제외하여 계산하였다. 제조사의 안내에 따른 Chlortetracycline hydrochloride의 물리적 특성을 표 3-2에 정리하였다.

표 3-2. Chlortetracycline hydrochloride의 특성

Characteristics	Chlortetracycline
CAS. no	64-72-2
Molecular formula (Hill notation)	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8 \cdot HCl$
Molecular weight	515.34
Melting point	210°C
pK <sub>a</sub> (25°C)	3.3, 7.4, 9.3
Solubility (25°C)	8.6 mg/mL in water
	17.4 mg/mL in methanol
	1.7 mg/mL in ethanol

### 3.1.3. 기타 실험 재료

화학물질의 용해 및 희석에는 Millipore 사의 Milli-Q를 통해 정수한 초순수를 사용하였다. pH 조절을 위해서 3 M HCl과 3 M NaOH를 이용하였다. 2가 양이온의 농도를 조절하기 위해 MgCl<sub>2</sub>를 수용액 형태로 제조하여 사용하였다.

## 제 2 절 회분식 중은 혐기성 소화 실험

### 3.2.1. 실험 방법

CTC 농도에 따른 우분의 혐기소화 과정을 관찰하기 위해 회분식 중은 혐기성 소화 실험을 수행하였다. 실험은 265 mL serum bottle을 회분식 반응조를 통해 수행되었다. 25 g의 우분과 75 mL의 슬러지를 혼합하여 100 mL의 유효 부피를 조성하였으며 이를 통해 일반적으로 운영되는 우분 혐기소화조의 총 고형물 농도 5% (by wet wt.) (Ciborowski, 2001)를 모사하고자 하였다 (그림 3-1). 혼합물의 초기 pH는  $8.2 \pm 0.1$ 로 확인되었다.

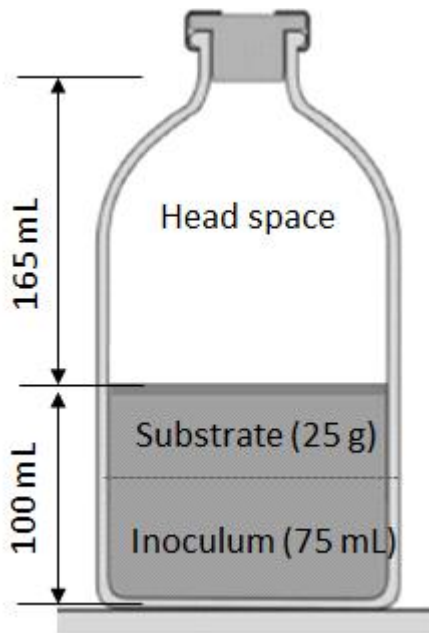


그림 3-1 회분식 반응조 단면도

반응조 내 CTC 농도 (0, 10, 25, 50 그리고 100 mg-CTC/L)에 따라 반

응조를 총 5 종류의 set로 구분하였다. CTC 농도는 10,000 mg-CTC/L의 수용액을 제조하여 0.1, 0.25, 0.5, 그리고 1 mL를 반응조에 주입함으로써 각각 10, 25, 50, 100 mg-CTC/L로 조성되었다. 10,000 mg-CTC/L의 수용액 주입으로 인한 부피 변화는 무시하였다. 또한 각 set (동일한 CTC 농도조건)의 유기물 감량 변화 및 반응조 상태를 연속적으로 확인하기 위해. 샘플링 날짜 (실험 시작 후 2, 5, 7, 10, 15, 그리고 30일)에 따라 6 개의 반응조를 각 set 별로 설치하였다. 샘플링 날짜는 20 일에서 30 일 동안 체류하는 우분 혐기소화조의 수리학적 체류시간을 모사하여 설정되었다. 실험은 duplicate로 진행되었으므로, 총 60 개의 회분식 반응조가 설치되었다. 최종적으로 모든 반응조는 질소가스로 3 분간 퍼징하여 고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하였다. 그리고 주사바늘을 통해 잔여 질소가스를 방출시킨 뒤,  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 130 rpm 조건의 배양기에 보관하였다. 표 3-3에 실험 셋팅 조건을 정리하여 나타내었다.

표 3-3. 우분 중온 소화 회분식 혐기 반응조 실험 조건

Experimental conditions	variables
Concentrations of CTC (mg/L)	0, 10, 25, 50, 100
Sampling days (day)	0, 2, 5, 10, 15, 30
Initial pH	8.2
Total solid (by wet wt.)	5%

## 제 3 절 Specific Methanogenic Activity test

### 3.3.1. 실험 방법

Specific Methanogenic Activity (SMA) test 는 슬러지 내 메탄생성균의 활성도를 비교하거나 혐기성 소화 중 특정 환경 요인의 변화에 따른 메탄생성균의 활성차이를 확인하기 위해 표준화된 실험방법이다. 본 실험은 pH와  $Mg^{2+}$  농도에 따라 다른 CTC의 존재형태가 혐기소화 과정에서 메탄발생에 미치는 차이를 확인하기 위해 수행되었다. OECD 311 표준 방법 (Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge: By Measurement of Gas Production)은 식종 슬러지와 기질의 농도를 사전 실험을 통해 결정할 것을 권장하고 있다. 본 실험에서는 Cetecioglu (2013)의 실험 결과에 따라 1-2 주 이내로 기질이 완전분해가 되도록 하는 기질의 종류와 농도, 접종물의 농도를 참고하였다.

120 mL serum bottle, 유효부피 60 mL을 통해 실험을 수행하였다. 기질로 아세트산 4,000 mg/L를 사용하였다. 접종물로 우분을 기질로 한 회분식 실험의 혐기소화 슬러지와 동일한 슬러지를 사용하였으며 2,000 mg/L (by volatile suspended solid)의 농도로 주입하였다 (그림 3-2). 실험의 변수는 CTC 농도 (0, 10, 50 mg/L), 초기 pH (7, 7.7, 8.5),  $Mg^{2+}$  농도 (0.1, 5, 15 mM)이다. CTC 농도, 초기 pH,  $Mg^{2+}$  농도를 고려하여 총 27 가지의 조건을 설정하였고, duplicate로 실험을 수행하였다.  $Mg^{2+}$ 를 주입하지 않은 경우에도 슬러지 내 양이온 농도로 인해  $Mg^{2+}$ 와  $Ca^{2+}$ 가 각각 약 0.1 mM로 존재하였기 때문에  $Mg^{2+}$ 를 주입하지 않은 경우에도 농도를 0.1 mM로 표기하였다 (표 3-4).

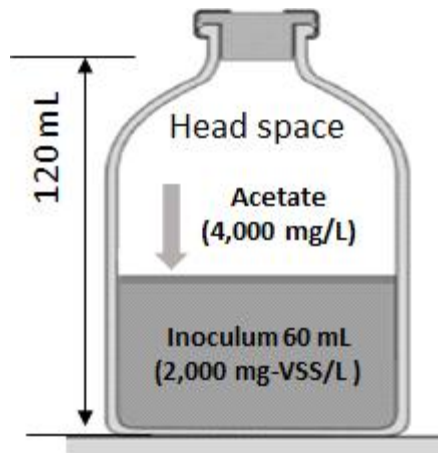


그림 3-2 SMA test 반응조 단면도

표 3-4. SMA test 반응조 실험 조건

Experimental conditions	variables
Concentrations of CTC (mg/L)	0, 10, 50
Initial pH	7, 7.7, 8.5
Concentration of cation (mM)	Mg <sup>2+</sup> : 0.1, 5, 15 (Ca <sup>2+</sup> : 0.1)
Total solid (by wet wt.)	0.1%
Substrate	Acetic acid 4,000 mg/L
Seeding sludge	2,000 mg-VSS/L



## 제 4 절 분석 방법

### 3.4.1. 물리화학적 성상 분석

#### 삼성분 분석

혐기성 소화 후 발생한 샘플의 수분 (Moisture), 휘발성 고형분 (Volatile Solids), 강열잔류 고형물 (Fixed Solids) 함량을 확인하기 위해 한국 폐기물공정시험기준 (2016)에 따라 삼성분 분석을 수행하였다. 수분함량은 샘플을 105℃ 건조기에서 24 시간 건조 한 후, 건조 전과의 무게 차이를 통해 계산하였다. 휘발성 고형분 함량은 건조 후 시료를 550℃ 강열기에서 3 시간 동안 강열 한 후, 강열 전과의 무게 차이를 통해 계산하였다. 강열잔류 고형물 함량은 강열 후 남은 재의 무게를 통해 확인하였다. 수분, 휘발성 고형분, 강열잔류 고형물의 함량의 합을 100%로 표준화하여 각 샘플 내 함량의 백분율을 산정하였다. 산정한 삼성분 함량은 고상 및 액상의 총 탄소 질량 수치 산정에 사용되었다.

#### 액상 수질 분석

기질 및 식중 슬러지, 그리고 혐기성 소화 후 발생한 샘플에 대해 액상 수질 분석을 수행하였다. 분석 항목은 pH, Total Ammonia (TNH<sub>3</sub>), Total Chemical Oxygen Demand (TCOD), Soluble Chemical Oxygen Demand (SCOD)이다. 액상 시료는 원심분리 (10,000 g, 15 분)한 뒤 상정액을 0.45- $\mu$ m 필터로 필터링한 것이 사용되었다. TNH<sub>3</sub>, TCOD, SCOD는 EPA standard methods에 근거하여 제조된 수질분석 키트 (Humas, Korea)를 사용해 측정하였다. TNH<sub>3</sub>는 Nessler method에 근거하여 측정되었다. TCOD, SCOD는 Molybdovanadate method에 근거하여 COD<sub>Cr</sub> 값이 측정되었다. 또한 분뇨 혐기성 소화의 주요 저해 인자로

서 Free ammonia의 농도를 구하기 위해  $TNH_3$ 와 pH 농도를 고려하여 식 2-1 (Hansen et al., 1998)을 사용하였다.

$$[NH_3] = [TNH_3] \cdot \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)})}}\right)^{-1} \quad (\text{식 2-1})$$

여기서,  $[NH_3]$  : Free ammonia 농도 (mg/L)

$[TNH_3]$ : Total ammonia 농도 (mg/L)

$T(K)$  : 온도 (K)

#### 금속 양이온 농도 분석

기질과 식중 슬러지에 존재하는 금속 양이온 농도를 분석하기 위해 ICP-OES spectrometer (iCAP 7400, Thermo, USA)를 사용하였다. 액상 시료는 원심분리 (10,000 g, 15 분) 한 뒤 상정액을 0.45- $\mu m$  필터로 필터링한 것을 사용하였다. 측정된 금속 양이온 종류는  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ 이다.

#### 알칼리도 및 FOS/TAC ratio

혐기성 소화 후 발생한 샘플에 대해 Nordmann's method (Nordmann, 1977)에 따라 알칼리도 및 FOS/TAC ratio 분석을 수행하였다. 알칼리도 (TAC 값)는 샘플의 산에 대한 완충 능력을 의미한다. FOS/TAC ratio는 volatile fatty acids (VFAs)의 총량 (FOS)과 알칼리도 (TAC)의 비율을 의미하며 혐기 소화조 생물학적 안정도를 평가하기 위해 활용된다. 시료는 원심분리 (10,000 g, 15 분) 한 뒤 상정액을 0.45- $\mu m$  필터로 필터링한 액상시료를 사용하였다. 알칼리도 (TAC 값)는 0.1 N 황산을 적

정용액으로 하여 pH 5.0까지 적정한 뒤 식 2-2에 따라 계산하였다. FOS 값은 pH 5.0에서 pH 4.4까지 적정한 뒤 식 2-3에 따라 계산하였다 (Kim, 2016).

$$Alkalinity(TAC)(mg\ CaCO_3/L) = \frac{A \times N \times 50,000}{mL\ sample} \quad (\text{식 } 2-2)$$

여기서, A : 사용된 적정 용액의 부피 (mL)

N : 적정 용액의 노르말 농도 (N)

$$FOS = ((\frac{20}{A} \times B \times 1.66) - 0.15) \times 500 \quad (\text{식 } 2-3)$$

여기서, A : 사용된 샘플의 부피 (mL)

B : pH 5에서 4.4까지 사용된 0.1 N 황산용액의 부피 (mL)

모든 분석 결과는 3 회 반복 수행하여 평균값을 사용하고 표준편차를 나타내었다.

### 3.4.2. 바이오 가스 분석

발생한 바이오 가스 (메탄, 이산화탄소) 및 질소의 양을 측정하기 위해 T 형 밸브에 압력계와 주사바늘, 유리주사기가 결합된 장치를 사용하였다. 주사 바늘이 시험용기에 삽입되면 압력계를 통해 용기 내부의 압력을 확인할 수 있다. 이후 밸브를 유리주사기 방향으로 열어주면, 발생한 가스에 의한 압력의 부피만큼 뒤로 밀린다. 용기 내부의 압력이 대기압과 같아질 때까지 주사기를 조절해준다. 그리고 주사기 눈금에 표시된 부피를 기록하여 표준상태 (25℃, 1 atm)으로 환산하여 가스 발생 부피를 측정하였다 (김민지, 2007).

가스의 조성을 측정하기 위해 Thermal conductivity detector가 장착되어있고, helium gas를 운반 기체로 사용하는 Gas Chromatography (ACME 6100, Younglin, Korea)를 사용하였다. Gas Chromatography 측정 조건을 표 3-5에 정리하였다.

표 3-5. 바이오 가스 조성 측정을 위한 Gas Chromatography 측정 조건

Item	Conditions
Model	ACME 6100 (Younglin, Korea)
Detector type	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	80/100 Porapak N (Agilent Technologies, USA) 10 ft × 1/8 in × 2.1 mm SS
Oven temp.	Initial : 80℃ for 2.5 min Temp. increase rate : 15℃/min Final : 120℃ for 1.5 min
Detector temp.	150℃
Injector temp.	150℃
Carrier gas	Helium, 3 mL/min

### 3.4.3. 탄소 분석

TOC analyzer (TOC-V<sub>CPH</sub>)를 이용하여 고, 액상의 탄소 및 유기탄소를 분석하였다. 실험 전후의 유기탄소를 분석하여 탄소 감량 및 탄소 질량 수지를 확인하고자 하였다. 액상시료는 채취한 샘플을 원심분리 (10,000 g, 15 분) 한 뒤 상징액을 0.45- $\mu$ m 필터로 필터링하여 사용하였다. 고상 시료는 채취한 샘플을 105°C에 24 시간 건조한 뒤 분쇄하여 사용하였다. 고, 액상의 유기탄소는 측정한 총 탄소와 무기탄소의 차를 통해 계산하였다.

### 3.4.4. Chlortetracycline 존재형태 분석

pH와  $Mg^{2+}$ 로 달리한 실험조건에 따른 Chlortetracycline의 존재형태를 확인하기 위해 Visual MINTEQ software (ver. 3.0)을 사용하였다. 본 연구에서는 총 고형물 함량 0.01% (by wet wt.)로 매우 낮은 상황을 고려하여, 수용액 상태의 조건만 고려하였다. pH는 고정 값 조건을 사용하였고, 이온강도 (Ionic strength)는 비고정 조건을 사용하였다. 온도 조건은 35°C로 고정하였다. 프로그램 내 CTC에 대한 정보가 존재하지 않아, CTC의 물질명 및 분자량을 Thermodatabase를 통해 등록하였다. CTC의 이온 존재형태 및 금속 결합상태 CTC 존재형태는 Aqueous species 메뉴를 통해 등록하였다. 존재형태 등록에 사용한 해리상수 및 결합상수는 표 3-6에 정리하여 나타내었다. 수용액 내 이온 종은 실험 시 유효 부피 내 존재하는 금속 양이온, pH 조정을 위해 사용한 NaOH, HCl로부터 발생한 Na, Cl 그리고 주입한 CTC를 고려하였다. CTC는 2가 음이온 형태의 CTC로 추가함으로서 해리상수 및 각종 결합상수로부터 수용

액 내 존재형태가 고려되도록 하였다. 혐기성 소화조에 존재하는 주요단위는 Molal 농도를 사용하였다. 검증은 전하 차이 비율 확인 그리고 참고문헌 (Zhang et al., 2014 (a); Zhang et al., 2014 (b))을 모사하여 얻은 존재형태의 농도별 상대오차 비교를 통해 수행하였다. 실험 조건 이외에 양이온 및 음이온이 CTC의 존재형태에 미치는 영향을 확인하기 위해 분뇨 내 존재 가능한 주요 양이온 및 음이온 농도의 범위를 조사하여 CTC 존재형태의 변화를 확인하였다.

표 3-6 Chlortetracycline의 해리상수 및 금속양이온과의 결합상수 (modified from Zhang et al., 2014)

Compound	Reactions	pKa (Dissociation constant)			
Chlortetracycline (CTC)	$\text{H}_3\text{CTC}^+ \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{H}_2\text{CTC}^0$	3.3 <sup>a</sup>			
	$\text{H}_2\text{CTC}^0 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCTC}^-$	7.4 <sup>a</sup>			
	$\text{HCTC}^- \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{CTC}^{2-}$	9.3 <sup>a</sup>			
		Log K (Complexation constant)			
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
	$\text{M}^{2+} + \text{HCTC}^- \leftrightarrow \text{MHCTC}^+$	3.4 <sup>b</sup>	3.9 <sup>b</sup>	7.5 <sup>c</sup>	3.8 <sup>c</sup>
	$\text{M}^{2+} + \text{CTC}^{2-} \leftrightarrow \text{MCTC}^0$	5.8 <sup>b</sup>	4.1 <sup>b</sup>	10.7 <sup>c</sup>	5.8 <sup>c</sup>

$\text{H}_2\text{CTC}^0$  : zwitterionic CTC;  $\text{HCTC}^-$  and  $\text{CTC}^{2-}$ : anionic CTC

$\text{MHCTC}^+$  and  $\text{MCTC}^0$  : divalent metal-anion CTC complexes

a: Guocheng et al., 2012

b: Werner et al., 2006

c: Carlotti et al., 2012



## 제 4 장 실험결과 및 분석

### 제 1 절 기질 및 식종슬러지의 물리화학적 성상

#### 4.1.1. 액상 수질 분석

우분과 혐기소화 슬러지의 액상에 대한 수질 분석을 위해,  $\text{TNH}_3$ , TCOD 및 SCOD 농도, pH에 대한 분석을 수행하였다 (표 4-1). 분석에 사용된 액상 시료는 원심분리 (10,000 g, 15 분)한 뒤 상징액을 0.45- $\mu\text{m}$  필터로 필터링한 것이 사용되었다. 모든 분석은 3회 반복으로 수행하였으며, 평균과 표준편차를 표기하였다.

표 4-1. 우분과 혐기소화 슬러지의 액상 수질 분석 결과

Item	Cattle manure (substrate)	Seeding sludge (Inoculum)
pH	$8.4 \pm 0.1$	$7.7 \pm 0.1$
Total $\text{NH}_3$ (mg/L)	$765 \pm 8$	$1,267 \pm 5$
TCOD (mg/L)	$74,844 \pm 3,852$	$31,052 \pm 1,452$
SCOD (mg/L)	$9,972 \pm 182$	$4,320 \pm 167$

#### 4.1.2. 금속 양이온 농도

우분과 혐기소화 슬러지의 액상에 존재하는 금속 양이온 농도 분석을 수행하였다 (표 4-2). 액상 시료는 원심분리 (10,000 g, 15 분) 한 뒤 상정액을 0.45- $\mu\text{m}$  필터로 필터링한 것을 사용하였다. 검출한계 0.01 mg/L를 기준으로 분석 결과  $\text{Zn}^{2+}$ 와  $\text{Cd}^{2+}$ 은 검출되지 않았다. 모든 분석은 3회 반복으로 수행하였으며, 평균과 표준편차를 표기하였다.

표 4-2. 우분과 혐기소화 슬러지의 금속 양이온 농도

Element (mg/L)	Cattle manure (substrate)	Seeding sludge (Inoculum)
$\text{Ca}^{2+}$	$61.8 \pm 9.6$	$246.4 \pm 15.1$
$\text{Mg}^{2+}$	$29.1 \pm 2.6$	$129.1 \pm 4.9$
$\text{Mn}^{2+}$	$0.6 \pm 0.1$	$3.0 \pm 0.2$
$\text{Fe}^{2+}$	$2.4 \pm 0.0$	$12.1 \pm 0.3$
$\text{Cu}^{2+}$	$0.5 \pm 0.2$	N.D
$\text{Zn}^{2+}$	N.D.	N.D.
$\text{Cd}^{2+}$	N.D.	N.D.

\* N.D. : Not Detected

### 4.1.3. 총 탄소 및 유기탄소 분석

우분과 혐기소화 슬러지의 액상, 고상에 존재하는 총 탄소 및 무기탄소 분석을 수행하였다. 총 탄소와 무기 탄소량의 차이를 통해 총 유기탄소의 양을 산정하였다 (표 4-3). 액상 시료는 원심분리 (10,000 g, 15 분)한 뒤 상정액을 0.45- $\mu$ m 필터로 필터링한 것을 사용하였고, 고상 시료는 105 °C에서 24 시간 건조된 시료를 채취하여 사용하였다. 모든 분석은 3 회 반복으로 수행하였으며, 평균과 표준편차를 표기하였다.

표 4-3. 우분과 혐기소화 슬러지의 총 탄소 및 유기탄소 함량

Phase	Item	Cattle manure (substrate)	Seeding sludge (Inoculum)
Solid	Total carbon (% by dry wt.)	32.4 $\pm$ 2.6	33.3 $\pm$ 1.6
	Inorganic carbon (% by dry wt.)	N.D.	3.3 $\pm$ 1.2
	Total organic carbon (% by dry wt.)	32.4 $\pm$ 2.6	30.0 $\pm$ 2.0
Liquid	Total carbon (mg C/L)	241.6 $\pm$ 2.6	98.5 $\pm$ 4.1
	Inorganic carbon (mg C/L)	80.8 $\pm$ 3.8	27.3 $\pm$ 4.2
	Total organic carbon (mg C/L)	160.8 $\pm$ 4.6	71.2 $\pm$ 5.8

N.D. : Not Detected

## 제 2 절 회분식 중은 혐기성 소화 실험

### 4.2.1. 유기물 감량 변화

혐기성 미생물은 유기물을 기질로 대사하여 생명활동을 유지한다. 따라서 CTC가 혐기성 소화에 미치는 영향을 확인하기 위해 유기물의 감량 변화를 지표로 하여 평가하였다. 유기물은 총 유기탄소, COD, VFAs로 나누어 분석하였다.

유기탄소를 통해 소화 전과 30일 후의 탄소분배를 확인하였다 (그림 4-1). 소화 전 유기탄소는 고상과 액상에 존재하는 양으로 나타내었고, 소화 30일 후의 유기탄소는 고상과 액상에 존재하는 양, 그리고 바이오가스 (메탄, 이산화탄소)로 전환된 양을 포함하였다. 그 결과, 소화 전 유기탄소의  $99 \pm 8\%$ 가 확인되었다. 소화 전 92.5%의 유기탄소는 고상에, 7.5%의 유기탄소는 액상에 존재하였다. 항생제를 주입하지 않은 대조군의 경우, 소화 30일 후 채취한 샘플에서 각각 78.8%, 5.4%의 유기탄소를 고상, 액상에서 확인하였다. 나머지 약 15%의 유기탄소는 메탄 (9.6%)과 이산화탄소 (5.5%)로 전환되었다. 유기탄소가 바이오가스 내 탄소로 전환된 양의 비율을 생분해도로 정의한다면, 항생제를 주입하지 않은 경우 15%의 생분해도를 나타낸다. 우분을 처리하는 혐기소화조는 생분해도를 16 - 78% 나타낸다고 보고된 바 있다 (Nasir et al., 2014). 이에 따라 본 실험의 생분해도는 매우 낮은 수준으로 판단된다. 생분해도가 낮은 경우 전처리 과정의 차이에 의한 것으로 사료된다. (Nasir et al., 2014). 본 실험에 사용한 우분은 채취 당시 bedding materials와 분뇨가 혼합된 형태였으며 채취 후 특정 고형물에 대한 분리가 진행되지 않은 상태로 활용되었다. Bedding materials는 생물학적 난분해성 물질인 lignin과 cellulose의 함량이 40 - 80% (by dry wt.)로 알려져 있다 (Changirath

et al., 2011). 그러므로 제거되지 않은 bedding material의 함량이 높은 시료의 사용이 낮은 생분해도의 원인으로 사료된다. bedding material과 분뇨의 무게 함량비는 산정할 수 없었다.

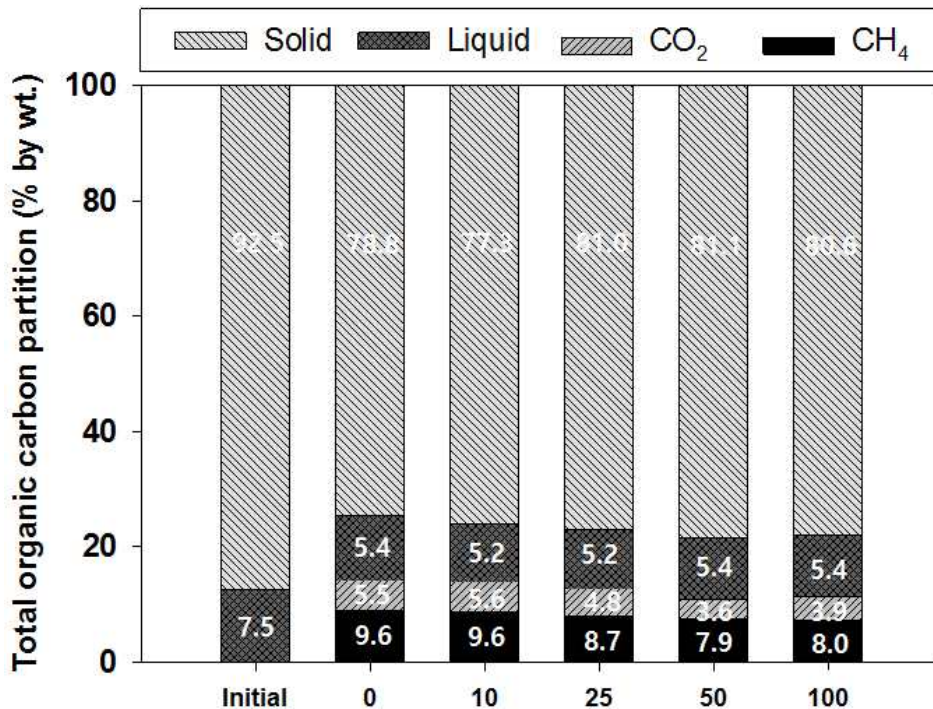


그림 4-1 초기 및 소화 30일 후 총 유기탄소 분배 분석 결과 (mg-CTC/L)

샘플링 시점 별 고상 및 액상 유기탄소 함량의 변화를 통해 CTC 농도 차이에 따른 유기물 감량에 대한 비교를 수행하고자 하였다. 하지만 고상 시료의 측정오차가 유기탄소 감량 변화율 보다 커, 통계적으로 신뢰도 있는 결과를 확인하지 못하였다. CTC 농도 0, 10, 25, 50, 그리고 100 mg/L의 실험에서 30일 간의 실험기간동안 액상 유기탄소의 순 감소량은 각각 42, 47, 47, 41, 그리고 43 mg C이었다. 그리고 메탄 및 이산화탄소로 전환된 유기탄소의 양은 각각 295, 299, 265, 224, 그리고 233 mg C

이었다. 액상 유기탄소 및 바이오가스의 유기탄소 측정 결과는 통계적 유의성이 확인되었다 ( $p < 0.05$ ). 메탄 및 이산화탄소의 탄소는 오직 액상과 고상의 유기탄소로부터 기원한다고 가정하였을 때, 바이오 가스 내 유기탄소량과 액상 유기탄소의 순 감소의 차이는 고상에서의 유기탄소 순 감소량에 해당한다고 할 수 있다. 계산된 고상에서의 유기탄소 순 감소량은 각각 253, 252, 218, 183, 그리고 190 mg C로 확인되었다. 이는 초기 고상 내 유기탄소량의 10 - 14%에 해당한다. 고상의 유기탄소의 측정 오차는 40 - 150 mg C로 초기 고상 내 유기탄소량의 2 - 10 %에 해당한다. 측정 오차 범위에서 유기 탄소량 변화가 관찰되었으므로 고상 유기탄소 변화에 대한 측정값 비교는 불가능하였다 (표 4-4).

표 4-4. 고상의 순 탄소 변화량 계산 및 고상 유기탄소 측정오차

TOC (mg C)	0	10	25	50	100
	(mg-CTC/L)				
Net reduction in liquid	42 ± 1	47 ± 1	47 ± 5	41 ± 10	43 ± 4
Biogas (CH <sub>4</sub> and CO <sub>2</sub> )	295 ± 12	299 ± 37	265 ± 3	224 ± 19	233 ± 18
Net reduction in solid	253 ± 12	252 ± 37	218 ± 5	183 ± 21	190 ± 18
Reduction of TOC in solid	14 ± 6	14 ± 10	12 ± 10	10 ± 6	10 ± 9
(% by dry wt. of initial TOC in solid)	%	%	%	%	%
Measurement errors for solids	40 - 150 mg C (2-10% by dry wt of initial TOC in solid)				

30일 간의 소화 기간 동안 용존성 유기 탄소 및 SCOD 값의 변화를 통해 가수분해가 속도 결정 단계였음을 확인하였다. 혐기성 소화 과정에서 입자성 유기물은 가수분해 된 뒤 용존성 유기물 형태로 산 생성, 아세트산 생성미생물의 대사를 거친다. 따라서 용존성 유기물 농도의 순변화량은 같은 시간 동안 진행된 입자성 유기물의 가수 분해량과 용존성 유기물의 이용량의 차이를 의미한다. 용존성 유기 탄소 농도는 실험 시작 2 일차까지 1,500 mg/L에서 2,000 mg/L까지 증가였다가 이후 계속 감소하여 1,000 mg/L 농도로 유지되었다. SCOD 농도는 실험 시작 2 일차까지 5,500 mg/L에서 6,000 mg/L까지 증가였다가 이후 계속 감소하여 2,000 mg/L 농도로 유지되었다 (그림 4-2, 4-3). 이는 실험 시작 2 일차까지 입자성 유기물의 분해속도가 용존성 유기물의 이용 속도보다 빨랐고, 이후에는 반대로 진행되었음을 의미한다. 따라서 기질 내 생물학적 이용이 쉬운 입자성 물질은 실험 초기 분해되고, 이후 bedding materials과 같은 난분해성 물질들의 가수분해가 진행됨에 따라 가수분해 과정이 속도 결정단계로 작용한 것으로 사료된다.

액상 내 VFAs는 가수분해의 산물이므로 유기물 분해 및 이용경향을 설명하기 위한 직접적인 지표로 쓰인다. 하지만 본 실험에서는 실험 시작 5일 후 검출한계 이하 (50 mg/L)의 VFAs가 검출됨에 따라 그 경향을 파악할 수 없었다 (Data are not shown).



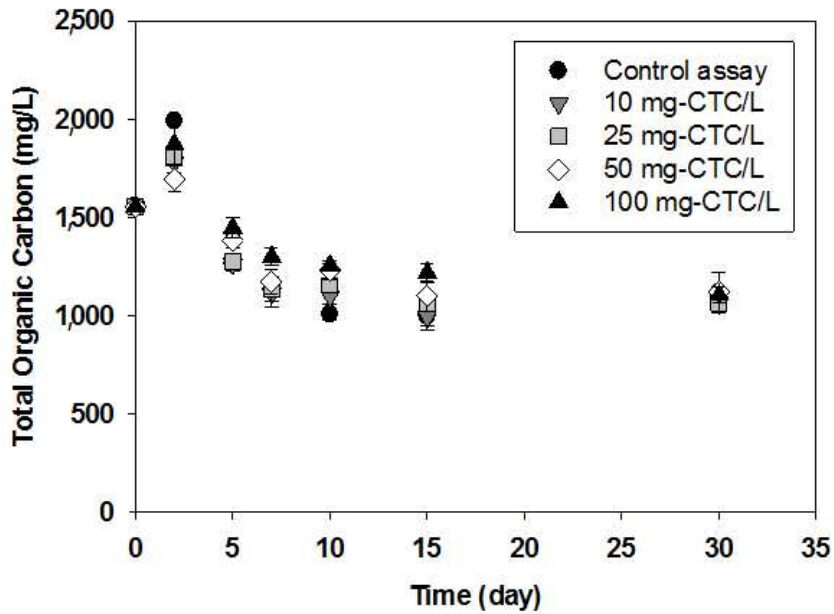


그림 4-2 30 일 소화 기간 동안의 용존 유기탄소 변화

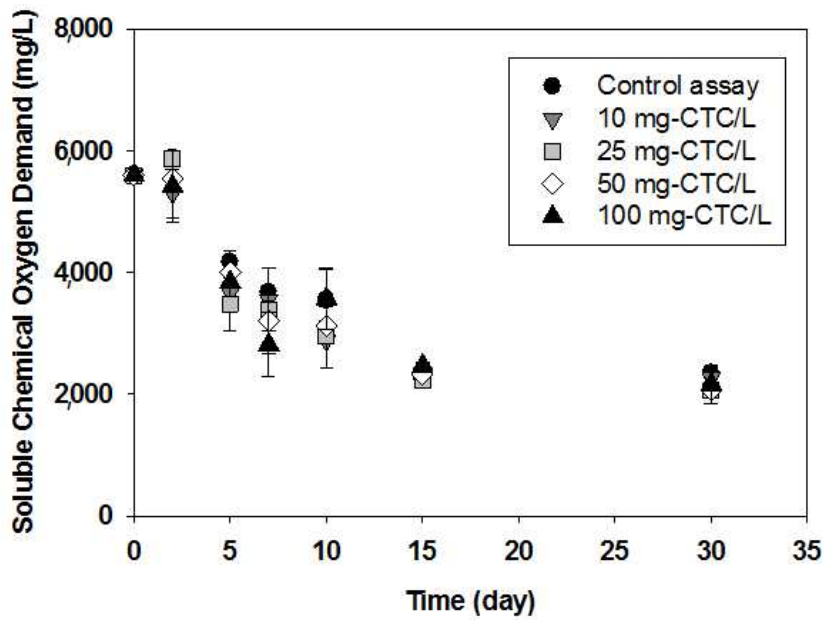


그림 4-3 30 일 소화 기간 동안의 SCOD 변화

#### 4.2.2. 메탄 발생량 비교

30 일간의 소화 기간 동안 발생한 단위 g-VS당 누적메탄 발생량을 각 실험 조건 별로 나타내었다 (그림 4-4). CTC 농도를 0, 10, 25, 50, 그리고 100 mg/L로 조성한 실험에서 각각 93, 94, 85, 74, 그리고 75 mL의 메탄이 발생하였다. CTC를 주입하지 않은 실험과 10 mg/L로 조성한 실험은 메탄 가스 발생에 차이를 나타내지 않았다 ( $p>0.05$ ). 25 mg-CTC/L 조건의 실험에서는 대조군 대비 약 90%의 메탄이 발생하였고, 50, 100 mg-CTC/L 조건의 실험에서는 80%의 메탄이 발생하였다. 이는 TCs가 혐기성 소화 중 메탄발생에 미치는 영향에 대해 보고한 기존 연구의 결과 대비 CTC의 영향이 상대적으로 크게 나타나지 않은 경우이다. Arikian (2006) 그리고 Ince (2013)은 중온 회분식 혐기성 소화를 통해 10 mg/L, 1 - 3.3 mg/L의 CTC를 함유한 분뇨가 대조군 대비 각각 27%, 50% 낮은 메탄 발생량을 나타냈다고 보고한 바 있다. 또한 Stone (2009)은 26 mg/L의 CTC를 함유한 돈분의 혐기소화는 대조군 대비 28% 낮은 메탄발생량을 나타냈다고 보고하였다. 지금까지 조사한 바에 따르면, 이러한 차이는 각 연구에서 사용한 식중 슬러지의 항생제 노출 여부와 그 정도에 의한 것이라는 예상이 있다 (Ince et al 2013). 본 장의 3 절과 4 절에서는 CTC 존재형태를 고려하여 CTC 영향 차이의 원인에 대한 논의가 이루어졌다.

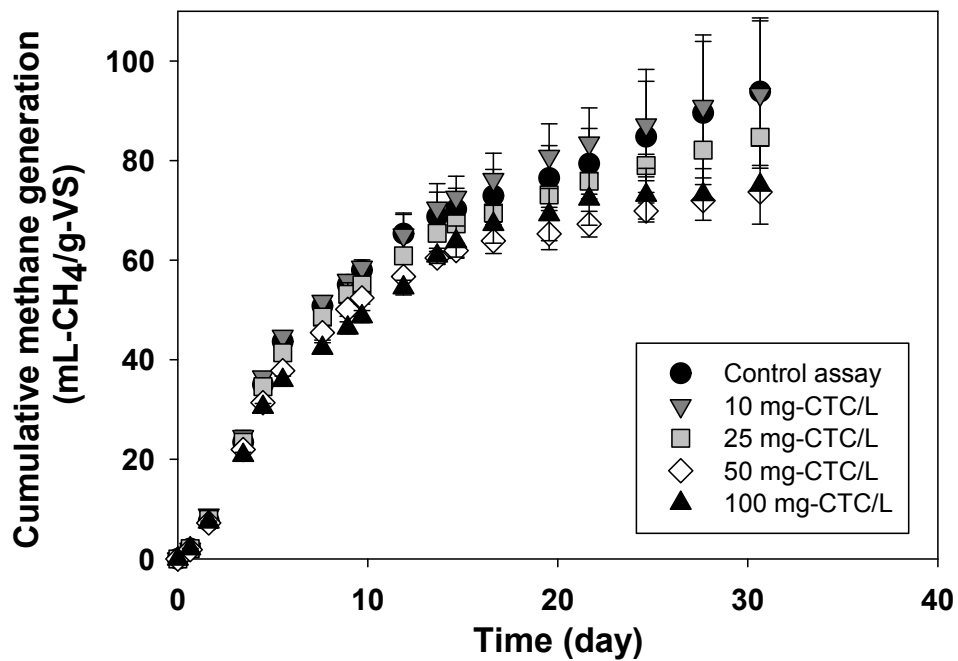


그림 4-4 CTC 농도 별 누적 메탄 발생량

### 4.2.3. 가수분해 속도 비교

메탄 발생 경향을 통해 가수분해 속도를 각 실험 조건별로 산정하여 비교하였다. 혐기성 소화의 가수분해과정은 1차 반응식 모델로 표현 된다 (식. 4-1).

$$\frac{dS}{dt} = -k_{hyd} \cdot S_t \quad (\text{식 4-1})$$

여기서,  $S$  : 기질의 농도 (mg/L)

$k_{hyd}$  : 가수분해 속도 상수 ( $\text{day}^{-1}$ )

하지만 4.2.1에서 설명한 것처럼 기질의 총 농도 변화를 확인하기 어려운 경우, 최대 메탄 발생량과 시간  $t$ 에서 메탄 발생량의 관계를 통해 간접적으로 가수분해 속도 상수를 산정할 수 있다 (Angelidaki et al., 2009) (식. 4-2).

$$1 - \frac{B}{B_t} = e^{-k_{hyd} \cdot t} \quad (\text{식 4-2})$$

여기서,  $B$  : 시간  $t$ 에서 누적메탄 발생량 (mL/g-VS)

$B_t$  : 최대 메탄 발생량 (mL/g-VS)

메탄 발생량 결과를 식 4-2에 적용하여 산정한 가수분해 속도 상수를 정리하여 표 4-5에 나타내었다. CTC 농도를 0, 10, 25, 50, 그리고 100

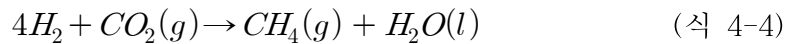
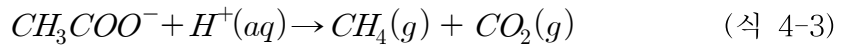
mg/L로 조성한 실험에서 각각 0.14, 0.13, 0.11, 0.09, 그리고 0.09 day<sup>-1</sup>의 가수분해 속도 상수를 확인하였다. CTC 농도가 25 mg/L로 조성된 경우 대조군에 비해 약 85%의 가수분해 속도를 나타내었고, 50, 100 mg/L 실험의 경우 약 70%의 가수분해 속도를 나타내었다. 우분의 혐기성 소화 중 가수분해 속도 상수는 0.2 - 0.6인 것으로 보고되었다. 기존 문헌에 따르면 본 실험의 가수분해 속도는 가장 낮은 수준에 속한다. 우분 내 bedding material이 포함되어 혐기성 소화가 진행될 경우 상대적으로 느린 가수분해가 일어난다고 보고된 바 있다. (Woods and Malina, 1965; Myint et al., 2007). 이는 앞서 4.2.1에서 설명한 바와 같이 입자성 유기물의 분해속도가 느린 원인으로 우분 내 bedding material을 예상한 것과 일치한다.

표 4-5 메탄발생량을 통해 산정한 CTC 농도 별 가수분해 속도 상수

Assay	Hydrolysis rate constant (day <sup>-1</sup> )
Control (0 mg-CTC/L)	0.14
10 mg-CTC/L	0.13
10 mg-CTC/L	0.11 (85% of control)
10 mg-CTC/L	0.09 (70% of control)
10 mg-CTC/L	0.09 (70% of control)

#### 4.2.4. Methanogenesis 영향

메탄과 이산화탄소의 발생량을 각 CTC 농도 조건별로 비교하여 CTC가 Methanogenesis 과정 중 Acetotrophic methanogenesis에 더 큰 영향을 미쳤음을 확인하였다. Methanogenesis는 아세트산의 환원반응을 통한 Acetotrophic methanogenesis (식 4-3)와 수소의 산화 반응을 통한 Hydrogenotrophic methanogenesis (식 4-4)를 통해 이루어진다.



따라서 Methanogenesis 과정 중 Acetotrophic methanogenesis가 저해 받을 경우 메탄 대비 이산화탄소의 비율이 낮을 것이라 예상하였고, Hydrogenotrophic methanogenesis가 저해 받을 경우 이산화탄소의 비율이 높을 것이라 예상하였다. 메탄과 이산화탄소의 대조군 대비 발생량 및 발생 몰비율을 정리하여 표 4-6에 나타내었다. 그 결과 CTC 농도가 높게 조성된 실험일수록 메탄 대비 이산화탄소의 몰비가 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 CTC에 의해 Methanogenesis 과정 중 Acetotrophic methanogenesis가 Hydrogenotrophic methanogenesis 보다 상대적으로 더 저해 받았음을 의미한다. 하지만 본 연구에서는 미생물 우점종 변화 분석 등 저해 차이에 대한 정량적 분석은 수행하지 않았다.

표 4-6 대조군 대비 상대적인 메탄 및 이산화탄소의 발생량 (% by vol.) 및 물  
비

Assay	Relative CH <sub>4</sub> generation (% compared to control)	Relative CO <sub>2</sub> generation (% compared to control)	Molar ratio (CH <sub>4</sub> : CO <sub>2</sub> )
Control (0 mg-CTC/L)	–	–	1 : 0.58
10 mg-CTC/L	0	0	1 : 0.58
10 mg-CTC/L	90	89	1 : 0.55
10 mg-CTC/L	79	65	1 : 0.47
10 mg-CTC/L	81	68	1 : 0.48

#### 4.2.5. 기타 저해인자 및 소화 조건 차이 확인

실험 기간 동안 CTC 이외의 저해 인자의 영향 여부 및 혐기성 소화 조건의 동일성을 확인하기 위해 pH, free ammonia 농도, FOS/TAC ratio 및 알칼리도 변화를 확인하였다. 각 항목에 대한 분석은 샘플링 날짜 별로 채취한 샘플을 대상으로 수행되었다.

pH는 실험기간 동안 8.2에서 7.6으로 감소하였으며 혐기소화 적정 pH 범위인 6.5 - 8.5 내에서 유지되었다. Free ammonia의 경우 저해 농도인 150 mg-N/L 미만으로 유지되었다 (그림 4-6) (Chen et al., 2008).

FOS/TAC ratio는 시스템 내 총 유기산 농도와 알칼리도의 비를 나타낸다. 실험 결과, 실험 초기 10 일 동안 0.4에서 0.1로 FOS/TAC ratio가 낮아졌다 (그림 4-6). 알칼리도가 동일 기간 동안 3,800 mg-CaCO<sub>3</sub>/L에서 5,500 mg-CaCO<sub>3</sub>/L로 약 44% 증가하였고, 총 유기산 농도는 1,520 mg/L에서 550 mg/L로 64% 감소하였다. 실험 초기 10 일까지 용존 유기산의 소모속도가 생산속도 보다 빨랐으나, 이후 두 속도가 유사하게 유지되었음을 의미한다. 이는 4.2.1에서 서술한 유기탄소 및 SCOD 값의 변화 경향과 일치하는 결과이다. 또한 상대적으로 가수분해가 빠른 음식물 쓰레기의 혐기소화 적정 FOS/TAC ratio는 약 0.3 - 0.4 로 유지되는 것을 고려할 때(Kim, 2016), 본 연구에서 진행된 우분의 혐기소화는 상대적으로 느린 가수분해 속도로 진행되었음을 유추 할 수 있다. 이는 4.2.3에 서술한 가수분해상수의 분석 결과와 일치한다.

모든 CTC 농도 조건에 대해 위 분석 항목에 대한 통계적 유의성이 확인되었다 ( $p>0.05$ ). 이는 동일한 조건으로 실험이 진행되었음을 의미한다. 그림 4-5, 4-6에는 대조군 (0 mg-CTC/L)과 100 mg-CTC/L 조건의 pH, 암모니아 변화만을 나타내었다.



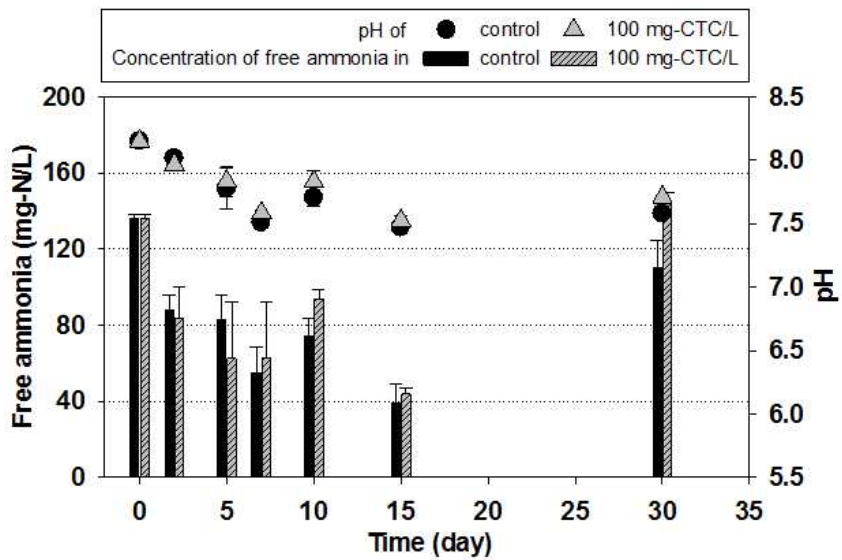


그림 4-5 샘플링 시간 별 pH 및 free ammonia 농도 변화

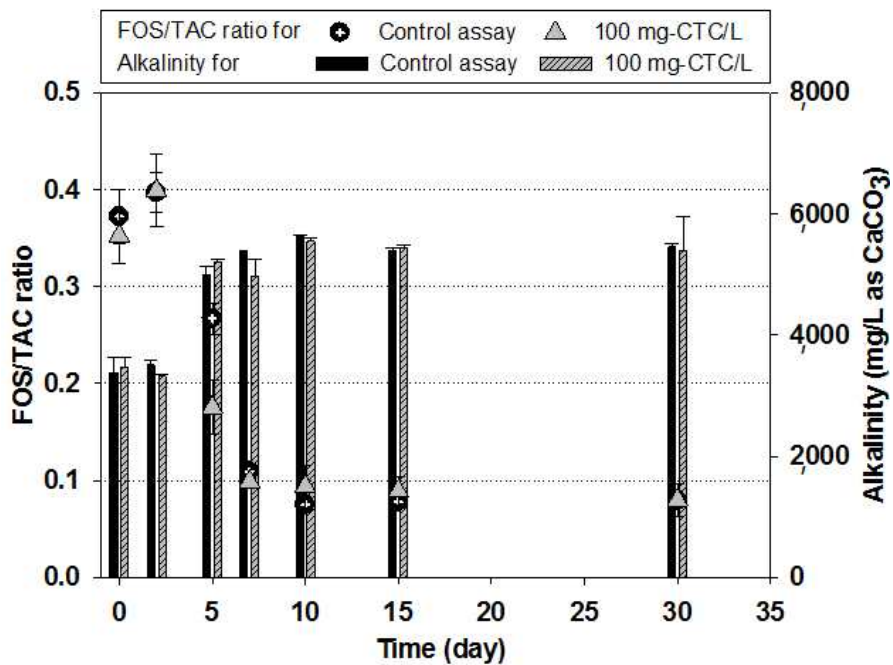


그림 4-6 샘플링 시간 별 FOS/TAC ratio 및 알칼리도 변화

### 제 3 절 Specific Methanogenic Activity test

#### 4.3.1. 메탄 발생량 비교

pH 및  $Mg^{2+}$  농도에 따른 CTC의 메탄 발생 저해 영향을 확인하기 위해 SMA test를 수행하였다. 실험의 변수는 CTC 농도 (0, 10, 50 mg/L), 초기 pH (7, 7.7, 8.5), 주입한  $Mg^{2+}$  농도 (0, 5, 15 mM)로 달리하여 총 27 가지의 조건을 설정하였고, duplicate로 진행되었다. 3 절에서는  $Mg^{2+} = 0$  mM 조건에서 pH 증가에 따른 CTC 농도 별 메탄 발생량 변화 그리고 pH 7 조건에서  $Mg^{2+}$  증가에 따른 CTC 농도 별 메탄 발생량 변화만을 나타내었다 (그림 4-7).

CTC가 주입되지 않은 대조군의 경우 pH 7, 7.7, 8.5에서 각각 83, 74, 42 mL의 메탄이 발생하였다 (그림 4-5 (A)). pH 6.5 - 7.5에서 메탄생성균의 활성이 최대화 되는 것으로 알려져 있다 (Chen et al., 2008). pH 증가에 따른 메탄 발생량 감소는 pH에 의한 메탄 생성균 활성 차이가 원인인 것으로 사료된다. 그림 4-7 (B)의 대조군에서는  $Mg^{2+}$  농도가 0, 5, 15 mM 일 때 각각 83, 83, 63 mL의 메탄이 발생하였다. 15 mM에서 더 적은 메탄이 발생한 이유는 18 - 20 mM의  $Mg^{2+}$  농도 범위가 용해되기 쉬운 단세포의 생산을 촉진하기 때문으로 사료 된다 (Chen et al., 2008).

이처럼 CTC 농도 증가와 관계없이 pH 또는  $Mg^{2+}$ 에 의해 메탄 발생량이 달라질 수 있다. 따라서 본 연구에서는 특정 pH,  $Mg^{2+}$  조건에서 CTC에 의한 저해영향만을 반영하기 위해 절대 메탄 발생량 대신 대조군 대비 발생한 메탄 발생량 (% by vol) 또는 저감된 메탄 발생량 (% by vol)을 사용하였다.

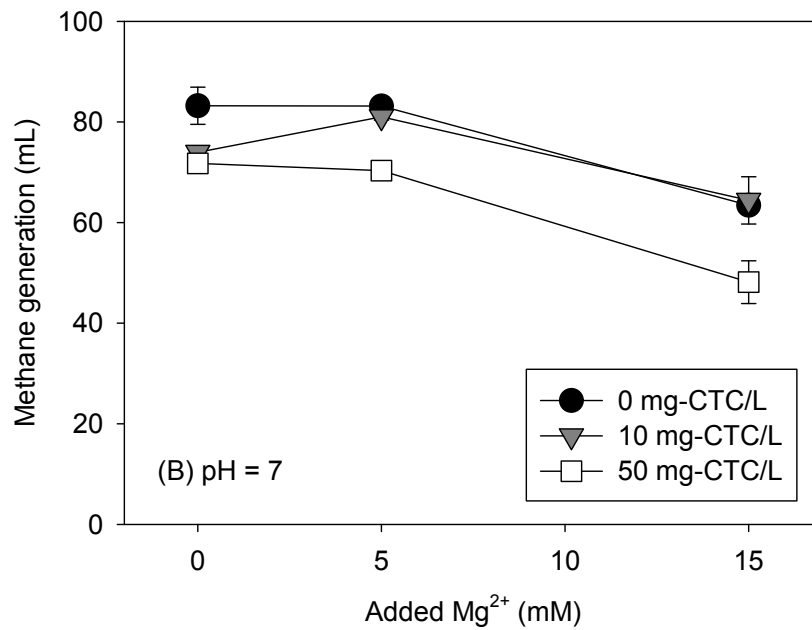
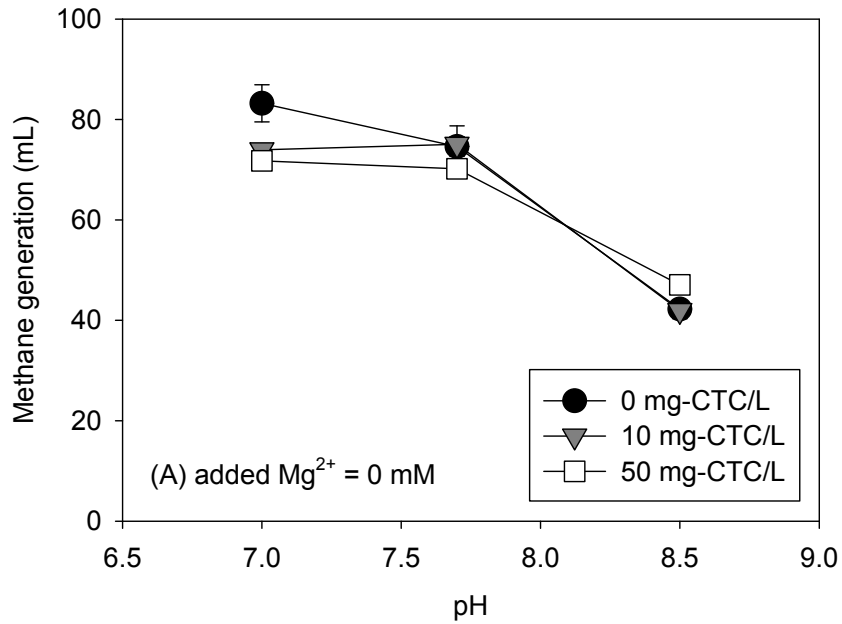


그림 4-7 SMA test 조건 별 메탄 발생량 (A) : added  $Mg^{2+} = 0$ , (B) pH = 7

#### 4.3.2. Chlortetracycline 존재형태 분석

pH,  $Mg^{2+}$ 를 달리하여 수행한 SMA test에서 각 조건 별 CTC의 존재 형태 비율 (표 4-7) 및 농도 (Data are not shown)를 Visul MINTEQ software (ver. 3.0)을 통해 분석하였다. 검증은 전하 차이 비율 확인 그리고 참고문헌 (Zhang et al., 2014 (a); Zhang et al., 2014 (b))을 모사하여 나타난 존재형태의 농도별 상대오차 비교를 통해 수행하였다. 검증 결과 모든 분석 결과에서 전하차이 4% 이하의 결과를 얻었다. 그리고 참고문헌 상의 결과와 비교하였을 때 상대오차가 4% 이하임을 확인하였다.

그 결과, pH 7,  $Mg^{2+} = 0$  mM의 조건에서 CTC 존재형태는 대부분  $H_2CTC^0$  (76% by concentration),  $HCTC^-$  (19%)로 확인되었다.  $Mg^{2+} = 0$  mM의 조건에서 pH 증가에 따른  $HCTC^-$ 의 증가는 CTC의 작용기 중 pKa가 7.4, 9.3인 작용기가 있기 때문인 것으로 사료된다. CTC는 chelate 결합을 쉽게 하는 것으로 알려져 있다. 본 분석결과를 통해서  $Mg^{2+}$  존재 시, 70 - 93% 이상의 높은 비율로 CTC가 금속결합 상태에서 존재하는 것이 확인되었다.

표 4-7 pH 및  $\text{Mg}^{2+}$  농도를 고려한 CTC 존재형태 ( $\text{H}_2\text{CTC}^0$  : zwitterionic CTC;  $\text{HCTC}^-$  and  $\text{CTC}^{2-}$ : anionic CTC;  $\text{MHCTC}^+$  and  $\text{MCTC}^0$  : divalent metal-anion CTC complexes)

pH	Added $\text{Mg}^{2+}$ (mM)	Speciation of CTC (% by concentration)				
		$\text{H}_2\text{CTC}^0$	$\text{HCTC}^-$	$\text{CTC}^{2-}$	$\text{MHCTC}^+$	$\text{MCTC}^0$
7	0	76	19	0	5	0
	5	25	6	0	68	0
	15	11	3	0	86	0
7.7	0	36	46	1	12	6
	5	6	8	0	84	2
	15	2	3	0	93	1
8.5	0	5	44	5	11	34
	5	1	7	1	79	12
	15	0	3	0	88	9

### 4.3.3. 다중회귀분석

SMA test를 통해 얻은 pH,  $Mg^{2+}$  농도 조건 별 대조군 대비 상대적 메탄 발생 저감량과 4.3.2에서 확인한 각 조건 별 CTC 존재형태의 농도를 다중회귀분석하여 CTC에 의한 메탄 발생 저감에 기여도가 큰 존재형태를 확인하고자 하였다. 이 과정에서 금속결합 CTC ( $MHCTC^+$  및  $MCTC^0$ )는 금속의 종류에 관계없이 메탄 발생 저감에 미치는 영향이 같은 것으로 가정하였다. 현재까지의 금속 종류 별 금속결합 CTC의 흡수 및 작용에 관한 문헌연구의 결과, 상반된 연구결과가 존재하며 단일 미생물 결과에 대한 단편적 결과만을 제시하고 있기 때문이다. 2.2.3에 서술한 바와 같이, 금속결합이 흡수 및 작용을 저해한다는 연구 (Zhang et al., 2013)와 촉진한다는 연구 (Yamaguchi et al., 1990; Orth et al., 1999)가 있다. 금속 결합이 흡수 및 작용을 촉진한다는 연구의 경우, 같은 그람 음성균에 대해서 금속종류에 따라 영향이 같다는 결과 (Pulicharla et al., 2015)와 다르다는 상반된 연구결과 (Orth et al., 1999)가 보고되었다. 따라서 결합 여부 및 전하상태만을 구분하여 존재형태를 구분하였다. 종속 변수는 각 조건 별 대조군 대비 상대적 메탄 발생 저감량을 사용하였다. 변수군은 (A)  $H_2CTC^0$ ,  $MHCTC^+$ ,  $MCTC^0$ ; (B) 전하의 종류 (+, -, 0); (C) 금속과 결합 여부에 따라 총 세 가지로 나누어 각각 다중회귀분석을 수행하였다. 그 이유는 CTC의 세포막 투과 및 작용기작의 중요한 존재형태가 주로 중성이온 또는 양성이온이며, 금속 결합 여부에 따라 달라지기 때문이다 (Pulicharla et al., 2017). 회귀방정식의 타당성은  $R^2$ , 계수의  $p$ -값 그리고 음이온이 양의 기여도를 나타내는 지 여부로 판단하였다.

그 결과, 변수군 (A)  $H_2CTC^0$ ,  $MHCTC^+$ ,  $MCTC^0$  가 CTC에 의한 메탄

발생 저감을 가장 잘 설명하는 것으로 나타났다 (표 4-8). 변수군 (B)는  $p$ -값을 만족하지 못하였고, (C)는  $R^2$ 의 값이 0.2으로 낮고 다중공선성이 높아 제외되었다. 변수군 (A)로부터 얻은 회귀방정식의 표준화 계수 비교 통해 금속결합 형태의 1가 양이온 ( $MHCTC^+$ ), 양쪽성이온 ( $H_2CTC^0$ ) 순으로 메탄 발생 저감의 기여도가 높았다. 금속결합형태의 중성이온은 표준화 계수에 따라 저해 기여도가 음의 값을 나타냄을 확인하였다. 회귀방정식의 종속 변수는 상대적 메탄 발생 저감 (%)이므로 이를 대조군 대비 상대적 메탄 발생량 (%)으로 나타내기 위해 100 (%)에서 기존의 회귀방정식을 뺀 형태로 회귀방정식을 수정하였다 (식 4-5).

표 4-8 변수군 (A)로부터 얻어진 회귀방정식의 주요 계수 및 인자

Variables	Coefficient	Standardized coefficients	$p$ -value	VIF	$R^2$
$H_2CTC^0$	206,251	0.483	0.005	1.067	0.7
$MHCTC^+$	116,302	0.630	0.001	1.203	
$MCTC^0$	-510,668	-0.435	0.012	1.164	

$$Y = 100 - (206,251 \times H_2CTC^0 + 116,302 \times MHCTC^+ - 510,668 \times MHCTC^0)$$

(식 4-5)

여기서,  $Y$  : 대조군 대비 상대적 메탄 발생량 (%)

각 변수의 단위 : mol/L

#### 4.3.4. Chlortetracycline에 의한 저해영향 발생 가능성 평가

분뇨 및 혐기성 소화조 내 존재 가능한 2가 양이온 및 음이온의 영향 정도를 확인하기 위해 문헌조사를 통하여 주요 2가 양이온, 음이온을 선정하였다. 1가 양이온 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  등)은 chelate 결합을 하지 않아 영향을 미치지 않는다 (Zhang et al., 2014 (a)). 또한 Visual MINTEQ을 통해서 1가 양이온 및 무기물로부터 발생한 음이온 ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HS}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ )이  $\text{Mg}^{2+}$  대비 존재하는 농도의 5 배 이상으로 존재 할 경우에도 CTC 존재 형태 농도 변화에 1% 이내의 영향을 미치는 것으로 확인하였다. 이에 따라 본 연구에서는 1가 양이온 및 무기물로부터 발생한 음이온은 무시할 수 있는 것으로 가정하였다.

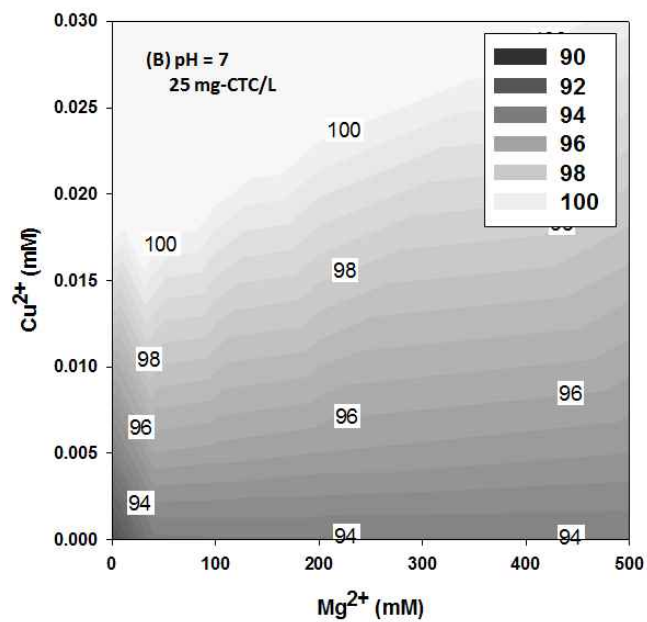
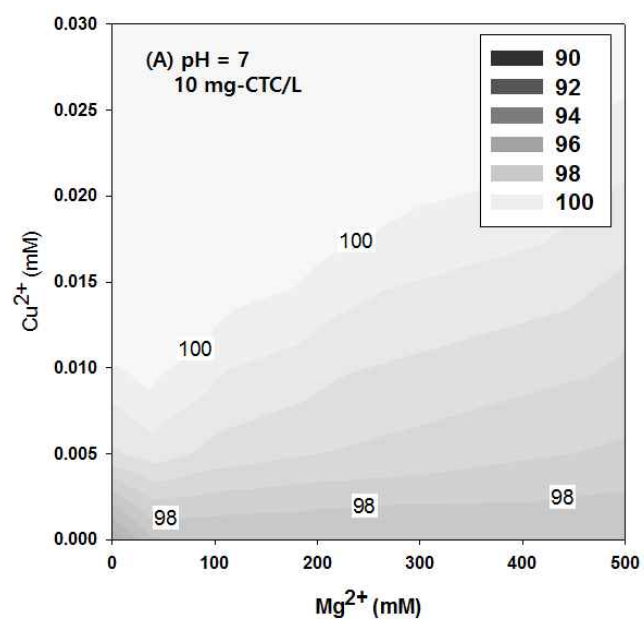
2가 양이온은  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ 로 선정하였다. (Chen et al., 2003). 유기물로부터 발생한 음이온은 혐기 소화조 내 주요 VFAs인 프로피온산, 부티르산으로 선정하였다. 그리고 각 이온의 농도를 문헌 상  $\text{Mg}^{2+}$  농도와의 비율을 기준으로 5 배 높고 낮은 범위로 하여 pH 7.7,  $\text{Mg}^{2+}=5 \text{ mM}$  조건 하에 CTC 존재형태를 확인하였다. 그 결과, CTC 존재형태에 가장 영향이 클 것으로 예상되는 이온은  $\text{Cu}^{2+}$ 였다.  $\text{Mg}^{2+}$  농도 대비 1,000 배 이하에서 금속결합형태 1가 양이온 CTC의 비율이 17 % 감소하고, 금속결합형태 중성이온 CTC의 비율이 18% 증가하였다. 그 이유는 결합상수 K가 다른 2가 양이온에 비해 1,000 - 1,000,000 배 크기 때문이다. VFAs로 부터 발생한 음이온은 CTC의 존재형태에 영향을 미치지 않았다 (표 4-9).



표 4-9 양이온 및 음이온 종류, 농도에 따른 CTC 존재형태 변화

pH	Mg <sup>2+</sup> (mM)	Additional cations or anions	MHCTC <sup>+</sup>	MCTC <sup>0</sup>
7.7	5	–	84	2
		Zn <sup>2+</sup> 0.05 mM	79	7
		Cu <sup>2+</sup> 0.005 mM	66	21
		Mn <sup>2+</sup> 0.12 mM	83	3
		Propionic acid 4,000 mg/L	85	2
		Butyric acid 4,000 mg/L	86	2

CTC에 의한 저해영향 발생 가능성을 평가하기 위해  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 의 농도를 각각 0.00 - 0.03 mM, 0 - 500 mM로 달리하여 CTC의 존재형태의 농도를 확인하였다. pH는 7, 8인 경우, CTC는 10 mg/L, 25 mg/L인 경우 총 네 가지 조건을 적용하였다. 그리고 각 존재형태의 농도를 식 4-5에 대입하여 대조군 대비 상대적인 메탄 발생량을 계산하였다. 그 결과를 정리하여 그림 4-6에 나타내었다. 그 결과, 모든 경우에 대해  $\text{Mg}^{2+}$ 에 거의 관계없이,  $\text{Cu}^{2+}$  농도변화에 따라 메탄 발생 정도가 달라지는 것을 확인하였다. pH 7, 25 mg-CTC/L 조건에서 대조군 대비 95%의 메탄이 발생할 것으로 예상되는  $\text{Cu}^{2+}$ 의 농도는 약 0.006 mM 이하였다. pH 8, 25 mg-CTC/L 조건에서는 0.003 mM 이하였다. 이는 분뇨 내  $\text{Cu}^{2+}$  농도를 고려할 때, 문헌조사 값 중 최저 값 이하이다. 분뇨 내 액상에 존재할 것으로 예상되는  $\text{Cu}^{2+}$  농도와 중성 pH 이상에서 가축분뇨의 혐기성 소화가 진행되는 것을 고려한다면, CTC에 의한 메탄 발생 저해는 미미할 것으로 예상된다.



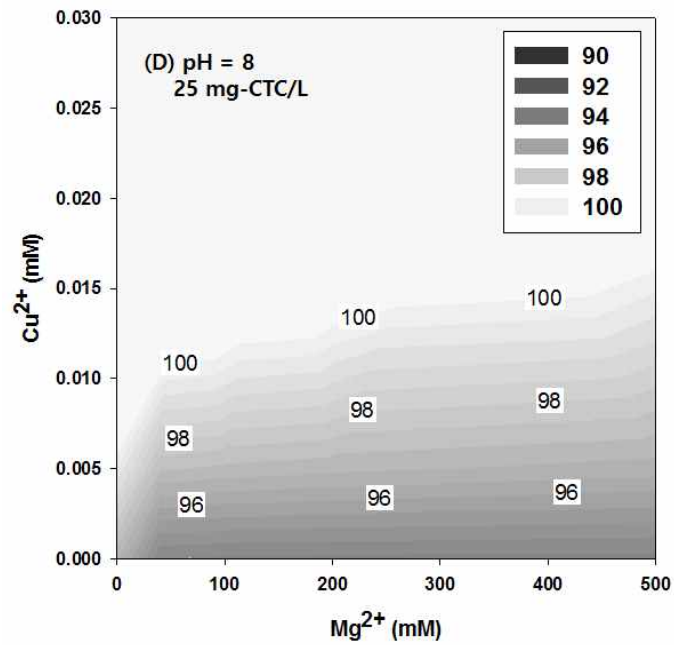
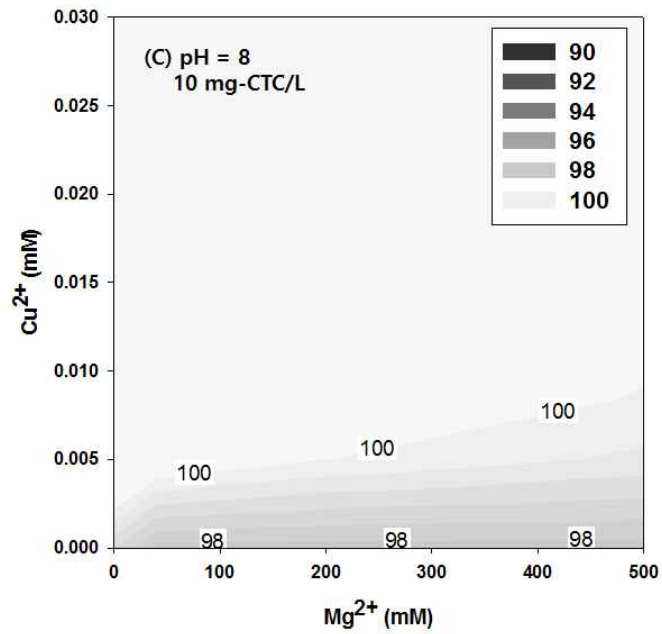


그림 4-6  $\text{Mg}^{2+}$  및  $\text{Cu}^{2+}$  농도에 따른 CTC 존재형태 농도를 고려한 예상 상대적 메탄 발생량 (단위 : %)

## 제 5 장 결론

본 연구에서는 Chlortetracycline (CTC)이 우분의 혐기성 소화에 미치는 영향과 CTC의 존재형태에 따른 영향 가능성 및 변화를 확인하고자 하였다. 그리고 혐기성 소화 환경 조건을 고려해 CTC가 혐기성 소화에 미치는 영향의 여부를 결정하고자 하였다. 회분식 중온 혐기성 소화 실험을 통해 CTC 농도에 따라 유기물 감량 및 바이오가스 발생에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 고상 유기 탄소의 측정오차가 유기 탄소 감량을 차이보다 커 유기 탄소 감량을 비교하지 못하였다. 하지만, 용존 유기 탄소 및 SCOD 변화를 통해 가수분해가 속도 결정 단계였음을 확인하였다. 이를 근거로 메탄 발생량을 이용해 가수 분해 속도상수를 결정하고, CTC 농도 증가에 따라 가수분해가 저해 받는다는 것을 확인하였다. 25 mg-CTC/L의 조건에서 대조군 대비 90%이 가스가 발생하였다. 분뇨 내 잔존할 것으로 예상되는 농도 (10 mg-CTC/L)에서는 메탄 발생에 저해가 일어나지 않았다. 또한 CTC 농도 증가에 따른 메탄과 이산화탄소의 발생 물비율을 비교함으로써 methanogenesis 중 acetogenotrophic methanogenesis가 hydrogenotrophic genesis 보다 CTC의 저해를 받은 것으로 확인하였다. pH와  $Mg^{2+}$  농도를 달리하여 CTC 농도별 메탄 발생량을 평가한 SMA test 결과와 각 조건 별 CTC의 존재형태 및 농도의 상관관계를 분석하였다. 금속결합 1가 양이온 CTC와 양쪽성 이온 형태의 CTC가 메탄 발생 저해에 가장 영향을 끼치는 존재형태임을 확인하였다. 이는 세포막 투과 및 항생 작용에 유리한 것으로 알려진 존재형태와 같다. 민감도 분석 결과 대부분의 CTC는  $Cu^{2+}$ 에 의해 금속결합 중성 CTC로 존재할 것으로 예상된다. 음이온은 영향을 거의 미치지 않았다. 결론적으로, 우분 내 존재할 것으로 예상되는 CTC의 농도와

우분의 액상 내 존재하는  $\text{Cu}^{2+}$  농도, 그리고 중성 이상의 pH를 고려하면, 우분의 혐기성 소화 중 메탄 발생 저해는 발생하지 않을 것으로 판단된다. 본 연구에서 평가한 저해 농도 이하로 잔류하며 대부분 저해 영향이 미미한 금속 결합 중성 CTC로 존재할 것이기 때문이다. 하지만 혐기성 소화 중 CTC의 흡수 및 작용에 미치는 고상의 영향을 확인하지 않은 한계가 있고 CTC의 장기노출 시 메탄 발생의 저해 농도가 낮아질 수 있다. 따라서 연속식 반응조를 이용해 장기노출의 효과와 상, 이온 조건 등 혐기성 소화 환경 인자를 고려한다면 우분의 혐기성 소화에 미치는 CTC의 영향 및 그 가능성을 더욱 정확하게 판단할 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

김민지 (2007). “BMP test에서 실험조건들이 글루코스의 메탄 발생에 미치는 영향.” 석사학위논문, 서울대학교 대학원

송민경 (2009). “혐기성 소화과정 내 메탄생성 미생물 그룹별 특성 연구.” DICER Report 2009 08

환경부 (2016). “폐기물공정시험기준.” 환경부고시 제2016-196호

Abbasi, T., S. M. Tauseef and S. A. Abbasi (2012). “Anaerobic digestion for global warming control and energy generation—An overview.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(5): 3228-3242.

Adekunle, K. F. and J. A. Okolie (2015). “A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion.” *Advances in Bioscience and Biotechnology* 06(03): 205-212.

Amani, T., M. Nosrati and T. R. Sreekrishnan (2010). “Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review.” *Environmental Reviews* 18(NA): 255-278.

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., and Van Lier, J. B. (2009). “Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays.” *Water Sci Technol*, 59(5), 927-934.

Arikan, O. A. (2008). “Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from

medicated calves." J Hazard Mater 158(2-3): 485-490.

Arikan, O. A., L. J. Sikora, W. Mulbry, S. U. Khan, C. Rice and G. D. Foster (2006). "The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves." Process Biochemistry 41(7): 1637-1643.

Boxall, A. B. (2004). "The environmental side effects of medication." EMBO reports, 5(12), 1110-1116.

Eduardo M., S. David, and Z. Kiara (2015). "Evaluating cost-effective greenhouse gas abatement by small-scale anaerobic digestion." Renewable Energy Association

Carlotti, B., A. Cesaretti and F. Elisei (2012). "Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques." Phys Chem Chem Phys 14(2): 823-834.

Cave, S. (2013). "Anaerobic Digestion across the UK and Europe." Northern Ireland Assembly.

Cetecioglu, Z., B. Ince, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz, D. Barcelo, D. Orhon and O. Ince (2013). "Chronic impact of tetracycline on the biodegradation of an organic substrate mixture under anaerobic conditions." Water Res 47(9): 2959-2969.

Changirath, S., Halbach, T. R., and Dorff, R. (2011). "Media and media mix evaluation for dairy barn compost bedding systems." Final report. Department of Soil, Water and Climate, University of Minnesota, St. Paul, MN.



Chen, S., Liao, W., Liu, C., Wen, Z., Kincaid, R. L., Harrison, J. H., and Stevens, D. J. (2003). "Value-added chemicals from animal manure (No. PNNL-14495)." Pacific Northwest National Lab., Richland, WA (US), Environmental Molecular Sciences Laboratory (US).

Chen, Y., J. J. Cheng and K. S. Creamer (2008). "Inhibition of anaerobic digestion process: a review." *Bioresour Technol* 99(10): 4044-4064.

Chen, Z., Y. Zhang, Y. Gao, S. A. Boyd, D. Zhu and H. Li (2015). "Influence of Dissolved Organic Matter on Tetracycline Bioavailability to an Antibiotic-Resistant Bacterium." *Environ Sci Technol* 49(18): 10903-10910.

Chenxi, W., A. L. Spongberg and J. D. Witter (2008). "Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry." *Chemosphere* 73(4): 511-518.

Chopra, I. (1985). "Mode of action of the tetracyclines and the nature of bacterial resistance to them." In *The tetracyclines* (pp. 317-392). Springer Berlin Heidelberg.

Chopra, I. and M. Roberts (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." *Microbiol Mol Biol Rev* 65(2): 232-260 ; second page, table of contents.

Ciborowski, P. (2001). "Anaerobic digestion of livestock manure for pollution control and energy production: A feasibility assessment. Minnesota Pollution Control Agency, United States Environmental

Protection Agency.” Disponível em: < [www.pca.state.mn.us/index.php/view-document.html](http://www.pca.state.mn.us/index.php/view-document.html).

Cook, H. J., Mundo, C. R., Fonseca, L., Gasque, L., and Moreno Esparza, R. (1993). “Influence of the diet on bioavailability of tetracycline.” *Biopharm Drug Dispos*, 14(6), 549–553.

Da Silva, J. F., and Dias, M. H. M. (1972). “METAL COMPLEXES OF TETRACYCLINES I. Complexes with alkaline-earth and transition metal ions.” *Reproduction*, 2, 5.

Daghrir, R. and P. Drogui (2013). “Tetracycline antibiotics in the environment: a review.” *Environmental Chemistry Letters* 11(3): 209–227.

De Liguoro, M., V. Cibir, F. Capolongo, B. Halling-Sørensen and C. Montesissa (2003). “Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil.” *Chemosphere* 52(1): 203–212.

Food and Drug Administration. (2016). “Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.” 2015.

Fountoulakis, M. S., K. Stamatelatou and G. Lyberatos (2008). “The effect of pharmaceuticals on the kinetics of methanogenesis and acetogenesis.” *Bioresour Technol* 99(15): 7083–7090.

Gaugain, M., Gautier, S., Bourcier, S., Jacques, A. M., Laurentie, M., Abjean, J. P. and Verdon, E. (2015). “6-Iso-chlortetracycline or keto form of chlortetracycline? Need for clarification for relevant monitoring of chlortetracycline residues in food.” *Food Additives &*

Contaminants: Part A, 32(7), 1105–1115.

Gelband, H., Molly Miller, P., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., and Laxminarayan, R. (2015). “The state of the world’s antibiotics 2015.” *Wound Healing Southern Africa*, 8(2), 30–34.

Gu, C., and Karthikeyan, K. G. (2005). “Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides.” *Environ Sci Technol*, 39(8), 2660–2667.

Gunaseelan, V. N. (1997). “Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review.” *Biomass and bioenergy*, 13(1–2), 83–114.

Guzman, M., J. Dille and S. Godet (2012). “Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria.” *Nanomedicine* 8(1): 37–45.

Hansen, K. H., Angelidaki, I., and Ahring, B. K. (1998). “Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia.” *Water Res*, 32(1), 5–12.

Huang, C. H., Renew, J. E., Smeby, K. L., Pinkston, K., and Sedlak, D. L. (2011). “Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis.” *Journal of Contemporary Water Research and Education*, 120(1), 4.

Ince, B., H. Coban, G. Turker, E. Ertekin and O. Ince (2013). “Effect of oxytetracycline on biogas production and active microbial populations during batch anaerobic digestion of cow manure.” *Bioprocess Biosyst Eng* 36(5): 541–546.

Khalid, A., M. Arshad, M. Anjum, T. Mahmood and L. Dawson (2011). "The anaerobic digestion of solid organic waste." *Waste Manag* 31(8): 1737–1744.

Kim. J. R. (2016) "Anaerobic digestion and acidification monitoring parameters for Korean food waste." Master's thesis, Graduate school of Seoul National University.

Kumar, K., S. C. Gupta, Y. Chander and A. K. Singh (2005). "Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment." 87: 1–54.

Kummerer, K. (Ed.). (2008). "Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks." Springer Science & Business Media.

Kummerer, K. (2009). "Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I." *Chemosphere* 75(4): 417–434.

Kwon, A. Y. and S. C. Kim (2015). "Estimating Predicted Environmental Concentration of Veterinary Antibiotics in Manure and Soil." *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 48(2): 100–104.

Linville, J. L., Y. Shen, M. M. Wu and M. Urgan-Demirtas (2015). "Current State of Anaerobic Digestion of Organic Wastes in North America." *Current Sustainable/Renewable Energy Reports* 2(4): 136–144.

Monnet, F. (2003). "An introduction to anaerobic digestion of organic wastes." *Remade Scotland*, 1–48.

Myint, M., N. Nirmalakhandan and R. E. Speece (2007). "Anaerobic fermentation of cattle manure: modeling of hydrolysis and

acidogenesis." *Water Res* 41(2): 323–332.

Nanavaty, J., Mortensen, J. E., and Shryock, T. R. (1998). "The effects of environmental conditions on the in vitro activity of selected antimicrobial agents against *Escherichia coli*." *Curr Microbiol*, 36(4), 212–215.

Nasir, I. M., T. I. Mohd. Ghazi, R. Omar and A. Idris (2014). "Bioreactor Performance in the Anaerobic Digestion of Cattle Manure: A Review." *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 36(13): 1476–1483.

Nikaido, H., and Thanassi, D. G. (1993). "Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples." *Antimicrob Agents Ch*, 37(7), 1393.

NIPA (2017) "Antibiotic Drugs"  
<http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html>, Accessed 6 June 2017

Openstax CNX (2017) "Structure of prokaryotes"  
<https://cnx.org/contents/nnx1QFeU@12/Structure-of-Prokaryotes>,  
Accessed 6 June 2017.

Orth, P., Saenger, W., and Hinrichs, W. (1999). "Tetracycline–chelated  $Mg^{2+}$  ion initiates helix unwinding in Tet repressor induction." *Biochemistry*, 38(1), 191–198.

Palm, G. J., T. Lederer, P. Orth, W. Saenger, M. Takahashi, W. Hillen and W. Hinrichs (2008). "Specific binding of divalent metal ions to tetracycline and to the Tet repressor/tetracycline complex." *J Biol Inorg Chem* 13(7): 1097–1110.

Pavlostathis, S. G. and E. Giraldo Gomez (1991). "Kinetics of anaerobic treatment: A critical review." *Critical Reviews in Environmental Control* 21(5-6): 411-490.

Pulicharla, R., R. K. Das, S. K. Brar, P. Drogui, S. J. Sarma, M. Verma, R. Y. Surampalli and J. R. Valero (2015). "Toxicity of chlortetracycline and its metal complexes to model microorganisms in wastewater sludge." *Sci Total Environ* 532: 669-675.

Pulicharla, R., K. Hegde, S. K. Brar and R. Y. Surampalli (2017). "Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment." *Environ Pollut* 221: 1-14.

Reith, J. H., Wijffels, R. H., and Barten, H. (2003). "Bio-methane and bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production." Dutch Biological Hydrogen Foundation.

Schnappinger, D., and Hillen, W. (1996). "Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms." *Arch Microbiol*, 165(6), 359-369.

Stone, J. J., S. A. Clay, Z. Zhu, K. L. Wong, L. R. Porath and G. M. Spellman (2009). "Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion." *Water Res* 43(18): 4740-4750.

Toerien, D. F., and Hattingh, W. H. J. (1969). "Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion." *Water Res*, 3(6), 385-416.

Tong, F., Y. Zhao, X. Gu, C. Gu and C. C. Lee (2015). "Joint toxicity of tetracycline with copper(II) and cadmium(II) to *Vibrio fischeri*:

effect of complexation reaction." *Ecotoxicology* 24(2): 346–355.

U.S. EPA (2016) "Livestock anaerobic digester database."  
<https://www.epa.gov/agstar/livestock-anaerobic-digester-database>

Werner, J. J., Arnold, W. A., and McNeill, K. (2006). "Water hardness as a photochemical parameter: tetracycline photolysis as a function of calcium concentration, magnesium concentration, and pH." *Environ Sci Technol*, 40(23), 7236–7241.

White, J. P., and Cantor, C. R. (1971). "Role of magnesium in the binding of tetracycline to *Escherichia coli* ribosomes." *J Mol Biol*, 58(1), 397–400.

Woods, C. E., and Malina, J. F. (1965). "Stage digestion of wastewater sludge." *J Water Pollut Con F*, 1495–1505.

Yamaguchi, A., Udagawa, T., and Sawai, T. (1990). "Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein." *J Biol Chem*, 265(9), 4809–4813.

Zhang, Y., S. A. Boyd, B. J. Teppen, J. M. Tiedje and H. Li (2014). "Organic acids enhance bioavailability of tetracycline in water to *Escherichia coli* for uptake and expression of antibiotic resistance." *Water Res* 65: 98–106.

Zhang, Y., S. A. Boyd, B. J. Teppen, J. M. Tiedje and H. Li (2014). "Role of tetracycline speciation in the bioavailability to *Escherichia coli* for uptake and expression of antibiotic resistance." *Environ Sci Technol* 48(9): 4893–4900.

Abstract

Effect of Chlortetracycline on  
Anaerobic Digestion of Cattle Manure:  
Focused on Chemical Forms of  
Chlortetracycline

Changmin Lee

Department of Civil and Environmental Engineering

The Graduate School

Seoul National University

The necessity for effective livestock manure treatment increases worldwide with incredible growth of factory farming systems. Among many ways of disposal for manure, anaerobic digestion (AD) has been used as a cost-benefit and environmental friendly way of disposal. AD process is a series of biological processes in which anaerobes utilize organic material as substrate and generate methane and carbon dioxide as final products. Many kinds and great quantity of antibiotics which inhibits growth and reproduction of



microorganisms by preventing from synthesizing protein and weakening cell wall are used for growth promotion and veterinary purposes and finally excreted as active form with manure. Chlortetracycline (CTC), which is one of member of tetracyclines, is one of the most-consumed veterinary antibiotics worldwide due to its broad-spectrum antibiotic effects and low price. CTC represents more than 70% of excretion rate. In addition, half-life and toxicity of CTC are ten to hundred times higher than those of the other major antibiotics. It is expected that CTC has high potential to inhibit AD of manure by remaining in the manure. And also CTC is ionic material in liquid phase because it has three functional groups with three pKa values and chelates with divalent metal cations such as  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . CTC represents different chemical forms and antimicrobial activities such as expression of resistance gene, toxicity, uptake rate depending on environmental conditions. Therefore, studying effect of CTC considering the chemical forms of CTC during AD of manure is necessary to identify inhibition possibility and effects. It can be utilized as criterion of environmental effects evaluation for AD of manure with antibiotics.

In this study, effect of CTC considering the chemical forms of CTC during AD of cattle manure which accounts for 81% of the number of AD plants in U.S. was studied. In order to identify changes of AD processes in reduction of organic materials and generation of biogas (methane and carbon dioxide) batch-wise anaerobic reactors were selected. The assays were divided into five types on the concentrations of CTC; 0, 10, 25, 50, and 100 mg-CTC/L. Each type

of batch reactor was set up for each sampling time to get samples depending on digestion period and investigate reduction of organic materials and state of AD systems. Cattle manure was captured from non-medicated calves and used as a substrate. In order to observe inhibitory effect of different chemical forms of CTC on methane generation during AD, specific methanogenic activity (SMA) tests were conducted. Different chemical forms of CTC were made by adjusting pH and concentrations of  $Mg^{2+}$ . Concentrations and relative ratio of each chemical form of CTC were identified by using Visual MINTEQ software (ver. 3.0). Contribution of each chemical form of CTC on inhibition to methane was distinguished by multiple regression analysis. Possibility of inhibition on AD for cattle manure by CTC was evaluated by considering chemical forms of CTC in environmental conditions of liquid phase during AD of cattle manure.

As a result of the batch tests, 10 mg-CTC/L which is the expected concentration of CTC in cattle manure had no difference in methane production compared to that of control although relative methane production of the assays in 25, 50, and 100 mg-CTC/L were 90, 79, and 80% of that of control assay, respectively. Comparison for reduction rate of organic carbon could not be conducted due to high measurement errors for organic carbon in solid phase. Among several steps of AD processes, inhibition to hydrolysis was identified by comparing hydrolysis rate constants. And also, by comparing molar ratio of methane and carbon dioxide, it is identified that acetogenotrophic methanogenesis was more inhibited by CTC than hydrogenotrophic methanogenesis. As a result of SMA tests and

multiple regression analysis, metal-CTC monovalent cation and zwitterionic neutral CTC were most influential chemical forms of CTC for inhibition to methane generation. It is in line with the facts that those are able to transfer through cell membrane and exert antimicrobial activity. In environmental conditions of AD for cattle manure, CTC was expected to exist as metal-CTC neutral cation by  $\text{Cu}^{2+}$  because complex constants of  $\text{Cu}^{2+}$  with CTC is hundred to thousand times higher than those of other metal cations. Anions from organic acids had no influence on the chemical forms of CTC.

In conclusion, inhibition of CTC to AD of cattle manure is expected to be insignificant considering possible residual concentrations of CTC and concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  with pH in the cattle manure which make CTC exist as uninfluential form (metal-CTC neutral cation). However, sorption of CTC to solid phase was not considered in this study and long-term exposure for sludge to CTC can lower minimum inhibition concentration for CTC. In order to fully evaluate possibility of inhibitory effect of CTC on AD, long-term performance of AD treating cattle manure containing CTC with continuous stirred tank reactors should be studied with consideration of environmental conditions such as phases and ion concentrations.

**keywords : Anaerobic digestion, Cattle manure, Antibiotics,  
Chlortetracycline, Methane**

***Student Number : 2015-22932***